

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Freiburg i. Br.

Direktor: Professor Dr. Dr. h. c. L. Heilmeyer

**Tierexperimentelle Untersuchungen
zur Bildung Insulin-Bindender
Antikörper und zur Insulinneutralisierung
durch diese Antikörper**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Medizinischen Doktorwürde

einer

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg i. Br.

vorgelegt

von

Dietrich Berning

geboren in

Berlin

1966

Dekan: Prof. Dr. H. N. Zollinger

Referent: Dozent Dr. Lothar Kerp



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Freiburg i.Br.
Direktor: Professor Dr.Dr.h.c. Dr.h.c. L. Heilmeyer

TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN
ZUR BILDUNG INSULIN-BINDENDER
ANTIKÖRPER UND ZUR INSULINNEUTRALISIERUNG
DURCH DIESE ANTIKÖRPER.

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung der Medizinischen Doktorwürde

einer

H o h e n M e d i z i n i s c h e n F a k u l t ä t

der

Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg i.Br.

vorgelegt

von

Dietrich Berning

geboren in

Berlin



INHALTSÜBERSICHT

EINLEITUNG:	Seite
Chemie des Insulinmoleküls:	1
Insulinantikörper-Nachweismethoden:	2
Versuche zur hyperglykämischen Wirkung von Antiinsulin-Meerschweinchenserum:	5
Immunologische Kriterien des Insulin- antikörpers:	7
PROBLEMSTELLUNG:	9
MATERIAL UND GERÄTE:	9
METHODIK:	
Immunisierung mit Insulin und Pikryl- chlorid als Adjuvans:	11
Immunisierung mit Insulin in Freund'schem Adjuvans:	13
Messung der Insulinbindung durch Meer- schweinchenserum mit der Cellulose- adsorptionsmethode:	14
Blutzuckermessungen an den immunisierten Meerschweinchen:	15
Bestimmung der Blutzuckerwirksamkeit von Antiinsulin-Meerschweinchenserum an der Maus:	15
Korrelationskurve und Berechnung des Bestimmtheitsmaßes:	19
ERGEBNISSE:	
1. Mit Insulin und Pikrylchlorid behan- delte Meerschweinchen:	21
2. Mit Insulin und Freund'schem Adjuvans behandelte Meerschweinchen:	29

3. Bestimmung der Blutzuckerwirksamkeit von Antiinsulin-Meerschweinchenseren und Korrelation mit dem "Antikörpertiter" dieser Seren	
a) Serummenge von 0,1 ml:	35
b) Serummenge von 1 ml:	40
c) Serummenge von 3 ml:	45
Kontrollversuche:	49
 DISKUSSION DER ERGEBNISSE:	 55
 ZUSAMMENFASSUNG:	 61
 TABELLEN:	 62
 LITERATURNACHWEIS:	 65

EINLEITUNG

Seit es Banting, Best und Collip 1921 gelang, Pankreas-extrakte herzustellen, die die Symptome des Diabetes mellitus beseitigten, vor allem jedoch seit der Reindarstellung des Insulins in kristalliner Form durch Abel (1926/27), wurden klinische und experimentelle Erfahrungen gesammelt, die eine bedeutungsvolle Nebenwirkung des Insulins wahrscheinlich machten: seine Wirkung als Antigen. Insulinresistenz und Insulinallergie sind seitdem bekannte Erscheinungen der Insulintherapie, die aber trotz einer Vielzahl experimenteller Bearbeitungen bis heute nicht ganz klare Deutungen gefunden haben.

Als Einführung in den Problemkreis der vorliegenden Arbeit sei es gestattet, Methodik und Ergebnisse der wichtigsten experimentellen Veröffentlichungen zum Thema der Antigeneigenschaften des Insulins kurz zu umreißen.

Zunächst sei daran erinnert, daß es Sanger u. Mitarb. 1955 gelang, Insulin als ein aus 2 Polypeptidketten von unterschiedlicher Länge (21 und 30 Aminosäuren) bestehendes Molekül vom Molekulargewicht 5734 aufzuklären. Die beiden Polypeptidketten sind durch 2 Disulfidbrücken miteinander verbunden. Das im Organismus vorkommende Insulin soll eine Symplexbildung aus mehreren solcher Moleküle sein, von denen in wässriger Lösung die dimere und die oktamere Verbindung besonders stabil sein soll. Im einzelnen Insulinmolekül scheint sich kein "aktives Zentrum" zu befinden, sondern die gesamte Kombination der Aminosäuren scheint für die spezifische Wirkung verantwortlich zu sein (K.O. Möller, Pharmakologie 1961).

Die bisher aufgeklärten Insuline verschiedener Tiere

zeigen in ihrem Molekül kleine Abweichungen voneinander. Diese geringe chemische Differenz zwischen den einzelnen Insulinen ist zwar für die Hormonwirkung unerheblich, spielt aber bei den Immunreaktionen wahrscheinlich eine Rolle (G. Kuschinsky, H. Lüllmann, Pharmakologie, 1964).

Insulin soll sich nicht kristallisieren lassen, ohne daß kleine Mengen Zink darin enthalten sind. Kristallines Insulin ist also ein Insulin-Zink-Komplex mit einem Molekulargewicht von ca. 36000, während das im Pankreas gebildete endogene Insulin kein Zink enthält (K.O. Möller, Pharmakologie, 1961).

Eine große Gruppe der Arbeiten über Insulin als Antigen experimentiert mit den in der Immunologie üblichen Antikörpernachweismethoden. Lewis (52), Barral u. Mitarb., Bernstein u. Mitarb. und Wassermann u. Mitarb., zit. nach (4), Moloney u. Mitarb. (59) und Wright (82) zeigten die hohe Spezifität der Reaktion zwischen Insulin und Insulinantikörpern in gegen Insulin sensibilisierten Tieren mit der Methode nach Schultz-Dale und der Auslösung einer anaphylaktischen Reaktion. Robinson u. Mitarb. (65), Arquilla u. Mitarb. (4,6) und Kalant u. Mitarb. (42) waren mit der passiven Hämagglutination, bei der Insulin-konjugierte Schafererythrozyten durch Anti-insulinseren agglutiniert wurden, in der Lage, spezifische gegen Insulin gerichtete Antikörper nachzuweisen. Robinson u. Mitarb. (65) unternahmen den in der vorliegenden Arbeit mit anderer Methodik wieder aufgenommenen Versuch, die Ergebnisse zweier verschiedener Insulinantikörpernachweismethoden auf ihre Beziehungen zueinander zu untersuchen und fanden eine eindeutige Korrelation zwischen hämagglu-

tinierender und Insulin-neutralisierender Wirkung in Antiinsulinseren des Meerschweinchens.

Versuche, Insulinantikörper mit der Komplement-Bindungs-Reaktion (74) und der spezifischen Präzipitation von Insulin und Antiseren nachzuweisen (Moloney u. Mitarb. 59,60, Morse 61, Jones u. Mitarb. 41, Steigerwald u. Mitarb. 73, Berson u. Mitarb. 11), waren im ganzen enttäuschend und wurden verlassen.

Größere Bedeutung erlangten dagegen Arbeiten mit markierten Insulinen. Berson u. Mitarb. (11) und Burrows u. Mitarb. (20) wiesen einen Insulin-Antikörper-Komplex mit Hilfe der Elektrophorese nach. Kalant u. Mitarb. (42,43), Berson u. Mitarb. (11,13), Skom u. Mitarb. (70), Burrows u. Mitarb. (20) und Welsh u. Mitarb. (79) schlossen indirekt aus der Eliminierungsrate einer markierten Testdosis Insulin aus dem Kreislauf Insulin-immunisierter Versuchstiere und Insulin-behandelter Patienten auf das Vorhandensein eines Insulin-bindenden Antikörpers. Berson u. Mitarb. (12,85) machten dabei die interessante Feststellung, daß auch die enzymatische Zerstörung des Insulins durch Insulinase in Gegenwart von Antiinsulinseren gehemmt verläuft.

Steigerwald u. Mitarb. (73) beobachteten, daß Insulin-immunisierte Kaninchen während der Immunisierungsperiode injiziertes Insulin-Fluorescein in Lymphknoten und Knochenmark speichern, während sie es in nicht-immunisierten Tieren stets in der Leber wiederfanden. Die relative Insulinresistenz dieser gleichen Immuntiere, die signifikant höhere Dosen Insulin ohne hypoglykämischen Schock vertrugen als nicht-immunisierte Kaninchen, brachten Steigerwald u. Mitarb. mit diesen Befunden in Zusammenhang. Sie nahmen an, daß injiziertes Insulin

in Lymphknoten und Knochenmark festgehalten wird und nicht an die Stellen seiner physiologischen Wirkung gelangen kann. Lacy (45) verwendete Fluorescein-markierte Antikörper aus den Seren gegen Rinderinsulin immunisierter Meerschweinchen, mit denen sich histologisch eine spezifische Anfärbung der beta-Zellen der Langerhansschen Inseln von Ratte, Hund, Katze und Huhn erzielen ließ. Interessant war der negative Befund an den beta-Zellen des Meerschweinchens. Es ist allerdings aus Lacys Versuchen nicht eindeutig zu schließen, ob eine immunologische Sonderstellung des Meerschweincheninsulins oder nur ein relativer Insulinmangel der beta-Zellen des Meerschweinchenpankreas, der eine nur geringe, mit Lacys Methodik nicht nachweisbare Anfärbung zustande kommen ließ, für diese negativen Befunde verantwortlich zu machen ist. Weiter unten mitgeteilte Ergebnisse sprechen aber sehr zugunsten der ersten möglichen Deutung.

Eine andere große Gruppe von Arbeiten macht die anti-hormonelle Wirksamkeit bestimmter Antiinsulinseren zum Gegenstand ihrer Methodik. Da die vorliegende Arbeit sich hiermit auseinanderzusetzen hat, sollen die Methoden, welche die Neutralisation "exogen" zugeführten und "endogen" im Tier gebildeten Insulins durch Antiinsulinseren messen, etwas näher erläutert werden.

Dazu dienten die ziemlich grobe "Maus-Antikonvulsions-technik" (hierbei injiziert man Insulindosen, die bei über 90 % der Mäuse Konvulsionen bewirken, und schließt auf einen neutralisierenden Antikörpereffekt, wenn simultan injizierte Antiinsulinseren die Überlebensrate der Tiere erhöhen) und eine verfeinerte, von Lowell (56) eingeführte Technik (sog. "Lowell Technik": Injektion kleiner Insulindosen mit Verlaufskontrolle des Blut-

zuckers; ein Insulin-neutralisierender Effekt wird daraus geschlossen, ob vorher, zugleich oder nachher injiziertes Antiinsulinserum die der Insulininjektion nachfolgende Hypoglykämie aufheben oder vermindern kann). Mit diesen beiden Techniken gelang es Moloney u. Mitarb. (59,60), Lacy (45), Wright (82,84), Arquilla u. Mitarb. (4,5,6), Baird u. Mitarb. (9), Goldsmith u. Mitarb. (33), Robinson u. Mitarb. (65) und de Fillipis u. Mitarb. (26), in Seren von Insulin-immunisierten Versuchstieren und Insulin-behandelten Patienten spezifische, die blutzuckersenkende Wirkung des Insulins neutralisierende Antikörper nachzuweisen.

Eine andere Methodik dieser Gruppe von Arbeiten wurde von Moloney und Coval (59) vorgeschlagen. Sie beruht auf der Beobachtung der Autoren, daß die Antiinsulinseren des Meerschweinchens in der Lage sind, in anderen Versuchstieren vorübergehende Hyperglykämien zu erzeugen. Bemerkenswert, jedoch noch nicht geklärt ist die Tatsache, daß bis jetzt nur das Meerschweinchen solche Seren zu liefern scheint. Dabei ließen sich eine Mitwirkung des Adrenalins oder anderer Blutzucker-wirksamer Substanzen des Meerschweinchensersums sowie unspezifische Fremdeiweißreaktionen an der Erzeugung der Blutzucker-erhöhung sicher ausschließen (1,83). Versuche von Wright (83,84), Armin u. Mitarb. (1,3) Cunningham u. Mitarb. (21) und Gregor u. Mitarb. (36) mit der Moloney-Coval-Technik führten bei verschiedenen Versuchstieren zu den gleichen Resultaten. Robinson und Wright (65) fanden die hyperglykämische Antwort auf Antiinsulin-Meerschweinchenseren an der Ratte so konstant, daß sie eine quantitative Methode zur

Messung der insulinneutralisierenden Wirkung von Antiinsulin-Meerschweinchenserum vorschlugen.

Dagegen gelang es bisher nicht, im Meerschweinchen selbst durch Injektion von Antiinsulin-Meerschweinchenserum eine Hyperglykämie zu erzeugen (1), eine Tatsache, die wie Lacys oben erwähnten Befunde (45) an den Langerhansschen Inseln des Meerschweinchenpankreas auf eine Sonderstellung des Meerschweincheninsulins hinweist.

In Erweiterung dieser Versuche waren Moloney und Coval (59) in der Lage, durch tägliche Injektionen von Antiinsulin-Meerschweinchenserum an der Maus ein mehrere Tage dauerndes reversibles "diabetisches Syndrom" mit Hyperglykämie, Glucosurie, Acetonurie und Gewichtsverlust zu erzeugen. Die Autoren nahmen an, daß Antiinsulin-Meerschweinchenserum wahrscheinlich nur gegen endogenes Mäuseinsulin wirksam war, so daß der Diabetes der Maus das Resultat eines relativen Insulinmangels durch die Neutralisation endogenen Insulins war. Diese Hypothese wurde von Armin u. Mitarb. (2,3), Gregor u. Mitarb. (36), Wright (83) und Hirata u. Mitarb. (40) experimentell auch an anderen Tieren gesichert.

Da es durch diese Versuche von Moloney und Coval möglich geworden ist, mittels Antiinsulinserum des Meerschweinchens in den Glucosestoffwechsel verschiedener Tiere einzugreifen, taucht die Frage auf, wie sich der Blutzucker der immunisierten Meerschweinchen selbst verhält. Alle Untersuchungen stimmen eindeutig darin überein, daß zu keiner Zeit während oder nach der Immunisierungsperiode von der Norm abweichende Blutzuckerwerte oder Glucosetoleranzteste gefunden wurden (5,6,59).

Zum anderen fand man die immunisierten Meerschweinchen

relativ insulinresistent, d.h. sie tolerierten für nicht-immunisierte Tiere tödliche Insulindosen (59,61,43). Ebenso waren in Versuchen von Morse (61), Steigerwald u. Mitarb. (73) und Burrows u. Mitarb. (20) Kaninchen nach wiederholten Insulininjektionen insulinresistent, wobei die Seren dieser Tiere aber im Gegensatz zu den Meerschweinchenserem Insulin in der Lowell-Technik nicht zu neutralisieren vermochten. Kalant u. Mitarb. (42) teilten dagegen mit, daß ihre mit Insulin immunisierten Kaninchen keine Insulinresistenz entwickelten, die Seren dieser Tiere jedoch markiertes Insulin zu binden vermochten.

Es scheint hieraus hervorzugehen, daß die untersuchten Antiinsulinseren nicht einheitlich waren. Lowell kam schon 1942 aufgrund seiner klinischen und experimentellen Untersuchungen zu dem Ergebnis, daß zwei durch physikalische und immunologische Kriterien wohl zu unterscheidende Antikörper gegen Insulin gebildet werden, von denen der eine, ein neutralisierender Antikörper für die Insulinresistenz, der andere, ein allergischer Antikörper (oder nach Lowellein "atopic reagin") für die Insulinallergie verantwortlich seien (53,54,55). Offenbar sind die Verhältnisse aber etwas komplizierter. Morse (62) und Yasuo Yagi u. Mitarb. (86,87) fanden, daß die Insulinantikörper in Immunseren vom Kaninchen andere Bindungsstellen am Insulin besetzen als die in Meerschweinchen-Immunseren. Arquilla und Finn (7) machten eine ähnliche Beobachtung sogar an der gleichen Tierart. Zwei hochgradige Meerschweincheninzuchtstämme bildeten Insulinantikörper, die sich durch ihre Bindungsstelle am Insulinmolekül unterschieden, und zwar fanden sich die gleichen Antikörper nur jeweils im gleichen Inzuchtstamm, was eine genetische Steuerung der Antikörpersynthese in Bezug auf die determinanten Gruppen im Insulinmolekül möglich erscheinen läßt.

Berson und Yalow (13,15) setzten sich mit der Frage der immunologischen Valenz des Insulinmoleküls auseinander. Sie untersuchten Seren insulinbehandelter Diabetiker, in denen Insulinantikörper mit Insulin in einem nicht präzipitierbaren Komplex reagierten, woraus sie auf eine Univalenz des Insulins schlossen. Weitere Experimente kamen jedoch zu dem Resultat, daß Insulin an mindestens zwei verschiedenen Stellen von Antikörpern gebunden werden müsse. Univalenz des Insulins bedeutet aber nicht, daß es nur eine antigene Determinante besitzt. Die Gegenwart zweier antigenen Determinanten ist insofern mit Univalenz des Antigenmoleküls vereinbar, als sterische Behinderung die Bindung von mehr als einem Antikörper unmöglich machen kann.

Abschließend läßt sich sagen, daß alle bisher untersuchten Tiere nach den üblichen Immunisierungsmethoden gegen Insulin Antikörper bilden, die aber in ihren Eigenschaften voneinander abweichen können. Daß das Insulinmolekül selbst, und nicht verunreinigende Begleitsubstanzen der Insulinpräparationen als Antigen fungiert, gilt heute als gesichert.

Eine Sonderstellung nimmt das Meerschweinchen ein, indem es als bisher einziges Tier Antiinsulinseren liefert, die auch endogenes Tierinsulin neutralisieren können. Das Meerschweincheninsulin selbst wird nach den bisher veröffentlichten Untersuchungen von Lacy (45), Wright (82), Moloney und Goldsmith (33) und Moloney und Coval (59) von keinem Antiinsulinserum neutralisiert, auch nicht vom Meerschweinchenantiinsulinserum und selbst nicht vom Antimeerschweincheninsulinserum des Meerschweinchens.

PROBLEMSTELLUNG

Die vorliegende Arbeit soll die Frage untersuchen, ob es durch intensive Dauerimmunisierung möglich ist, Meerschweinchen zur Produktion von Insulinantikörpern anzuregen, die sich gegen das endogene Insulin des Tieres selbst richten. Der Verlauf der Immunisierung wurde mit einer von Kerp, Steinhilber und Kasemir (44,44a) entwickelten Methode verfolgt, die es gestattet, insulinbindende Antikörper im Serum quantitativ zu bestimmen. Gleichzeitig soll eine mögliche Beziehung zwischen dem Gehalt insulinbindender Antikörper im Serum und der allergischen Hautreaktion des Tieres geprüft werden.

Mit den Seren der Immuntiere werden zwei verschiedene Insulinantikörper-Nachweismethoden - eine in vivo- und eine in vitro-Methode - auf ihre Korrelation zueinander untersucht. Als in vivo-Methode wurde die Hyperglykämie der Maus nach Injektion von Antiinsulinseren nach Moloney und Coval (59), als in vitro-Methode die Technik der Differentialadsorption von Kerp und Steinhilber (44,44a) gewählt.

MATERIAL UND GERÄTE

Antigen: kristallines Rinder-Schweineinsulin ("Altinsulin") der Farbwerke Hoechst, das in 1 ml 40 E Insulin enthält.

Adjuvantien: Pikrylchlorid "rein", Fluca AG.
Verwendet wurde eine Lösung, die in 1000 ccm phys. Kochsalzlösung 12,5 mg Pikrylchlorid gelöst enthielt.
Freund's Adjuvans (nach der Originalarbeit von Freund (31)):
Bayol F (Esso Standard Oil Company)
Arlacel A (Atlas Powder Comp.)

Mycobacterium tuberculosis Typ H, Stamm Rv 37.

Arlacel A und Bayol F wurden im Verhältnis 1,5 : 8,5 mit 5 mg Mycobacterium tub. gemischt und autoklaviert. Danach wurde Antigen und phys. Kochsalzlösung in einer Menge dazugegeben, daß das Volumenverhältnis von Antigen und phys. Kochsalzlösung zu Arlacel A und Bayol F 1 : 1 betrug (sog. komplettes Freund's Adjuvans). Inkomplettes Freund's Adjuvans wurde in der gleichen Weise unter Ausschluß von Tuberkelbakterien hergestellt.

Durch wiederholtes Aufziehen und Ausspritzen mit einer 50 ml Rekordspritze mit weiter Kanüle wurde das Gemisch so lange emulgiert, bis ein Tropfen der Emulsion in Eiswasser seine Form beibehielt. Das fertige Adjuvans wurde über Nacht bei 4° C aufbewahrt und am nächsten Tag verwendet.

Humanalbumin "reinst", Behringwerke; MG 65000. Rinderinsulin-131 J wurde von den Farbwerken Hoechst AG. hergestellt. Die Markierung erfolgte nach Angaben der Hersteller durch Einwirkung von elementarem 131-Jod auf hochgereinigtes Rinderinsulin ohne Zusatz von Oxydationsmitteln bei pH 7,3. Nicht Insulin gebundenes Jod wurde anschließend durch mehrstündige Dialyse entfernt. Durch Zugabe von albuminhaltigem ($3,85 \cdot 10^{-5} \text{m}$) Phosphatpuffer (pH 8,0; $0,04 \text{m}$) wurde eine Rinderinsulininstammlösung von 1 E/ml ($6,42 \cdot 10^{-6}$) hergestellt. Die spezifische Aktivität des markierten Insulins betrug zwischen 8,0 und 16,5 mC/mg Insulin. Die markierten Insulinmoleküle enthielten pro Sangereinheit im Durchschnitt 0,2 - 1,0 Jodatome (44a).

Puffersubstanzen: KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 p.a. Merck. Cellulosepulver der Fa. Macherey und Nagel.

Scintillationszähler: FH 488 und FH 451 Friesecke und Höpfner.

Zählgerät: Strahlungsmeßgerät FH 49 Friesecke und Höpfner.

"Liquemin": Heparinpräparat der Fa. Roche.

"Biochemica-Test-Combination" der Fa. Boehringer: Reagentien zur Bestimmung der "wahren" Glucose in Blut, Serum und Liquor, enthaltend "Chromogen", Puffer-Enzymgemisch und Glucose-Standard-Lösung.

Perchlorsäure p.a. Merck, ca. 0,33 m. Es wurde eine Lösung verwendet, die in 100 ml bidestilliertem Wasser 2,85 ml 70 % Perchlorsäure enthielt.

37 männliche, jugendliche Meerschweinchen; durchschnittliches Gewicht 250 g.

100 männliche weiße Mäuse; durchschnittliches Gewicht 20 - 30 g.

METHODEN

37 Meerschweinchen, der Jahreszeit entsprechend ernährt, wurden in zwei Gruppen geteilt auf zwei verschiedene Arten immunisiert.

25 Meerschweinchen (im folgenden kurz Pikrylchlorid-Gruppe genannt) wurden zunächst 25 Tage lang mit Pikrylchlorid behandelt. Die Tiere erhielten jeden Tag 0,0025 mg Pikrylchlorid in 0,2 ml phys. Kochsalzlösung intrakutan auf 4 Stellen verteilt in die rasierte Rückenhaut. Diese Methodik erwies sich nach den Arbeiten von Landsteiner u. Mitarb. (46,47,48), Benacerraf und Gell (10) und Eisen u. Mitarb. (24) als besonders geeignet, Meerschweinchen gegen Pikrylchlorid zu sensibilisieren. Um bei der Sensibilisierung ein möglichst großes Hautgebiet zu erfassen, wurden die Injektionsstellen täglich gewechselt.

Danach wurden 5 Tiere dieser Gruppe als "Kontrolltiere" ausgesondert. Sie erhielten nach dem gleichen Schema während des ganzen Versuchs nur Pikrylchlorid.

Bei den übrigen 20 Tieren wurde nach der 25. Pikrylchloridinjektion der Behandlungsmodus geändert. Sie erhielten 70 Tage lang ein Insulin-Pikrylchlorid-gemisch, das in 100 ml phys. Kochsalzlösung 0,833 mg Pikrylchlorid und 400 E Insulin enthielt. Diese Pikrylchlorid-Insulin-Lösung wurde einige Tage vor der Injektion angesetzt und bei Zimmertemperatur unter Lichtabschluß aufbewahrt. Jedem Meerschweinchen wurde täglich 0,3 ml dieser Lösung in der oben angegebenen Weise in die Rückenhaut injiziert, so daß pro Tier eine tägliche Dosis von 0,0025 Pikrylchlorid und 1,2 E Insulin zur Immunisierung verwendet wurden.

Die während des Versuchs verwendeten Gesamtdosen an Pikrylchlorid und Insulin betrugen pro Tier 2,375 g Pikrylchlorid und 84 E Insulin bzw. bei den "Kontrolltieren" 2,375 g Pikrylchlorid.

Vor und während des Versuchs wurden den Meerschweinchen in regelmäßigen Zeitabständen Blutproben von 1 - 2 ml aus dem Ohr oder einer Schenkelvene in ein Reagenzglas entnommen. Das Blut wurde 2 - 3 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen, anschließend 15 Min. bei 3000 U/Min. zentrifugiert, das überstehende Serum dekantiert und bis zur Antikörperbestimmung bei -20°C eingefroren.

36 Tage nach der letzten Injektion wurde die Hautsensibilität der Tiere geprüft. Als Antigen diente das gleiche auch zur Sensibilisierung verwendete Insulin in einer Dosierung von 0,2 E pro Tier. Als Kontrollen dienten Injektionen von phys. Kochsalzlösung allein. Die Hautreaktionen wurden nach 15 Min. und 48 Std. abgelesen. Als Maß für die Stärke der Reaktion diente nach 15 Min. die Größe

des geröteten Hautbezirks in mm^2 , nach 48 Std. die Stärke der Knötchenbildung bzw. Nekrose, die als neg. = negativ,

(+) = schwach positiv,

+ = positiv,

++ = stark positiv und

+++ = sehr stark positiv

bewertet wurde. Die Tiere wurden wenige Tage danach getötet, durch Kehlschnitt ausgeblutet, das Blut in Zentrifugengläsern aufgefangen, das überstehende Serum dekantiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

Die übrigen 12 Meerschweinchen wurden auf eine andere Art gegen Insulin immunisiert. Wie aus den Arbeiten von Lewis und Loomis (50), (51,52), Vallée (22), Freund u. Mitarb. (28,29,30,31), Rist (64), Fischel u. Mitarb. (27) und White u. Mitarb. (80) u.a. entnommen wurde, kommt einer Verbindung von abgetöteten Tuberkelbakterien und Mineralölen in ganz hervorragender Weise bei der Immunisierung gegen verschiedene Antigene Adjuvanswirkung zu. In dieser Meerschweinchengruppe kam eine von Freund (31) vorgeschlagene Mischung der einzelnen Komponenten zur Anwendung. Diese Meerschweinchengruppe wird im folgenden kurz "Freund's Adjuvans Gruppe" genannt.

Jedes der 12 Meerschweinchen erhielt als erste Injektion 1 ml komplettes Freund's Adjuvans in das subkutane Gewebe des Nackens (Technik nach Couland). Durch diese Injektion wurde jedem Tier 8 E Insulin auf einmal beigebracht. An 20 folgenden Tagen wurden

den Meerschweinchen jeweils 0,1 ml inkomplettes Freund's Adjuvans mit 0,3 E Insulin in die gleiche Stelle des Nackens wie bei der ersten Injektion subkutan gegeben. Am 21. Tag wurde die erste Injektion zu 1 ml Freund's Adjuvans mit 8 E Insulin bei allen 12 Tieren wiederholt und die Behandlung über weitere 51 Tage mit 0,1 ml inkompletten Freund's Adjuvans mit 0,3 E Insulin fortgesetzt.

Jedes Tier erhielt im Verlauf der Immunisierung eine Gesamtdosis von 38,2 E Insulin und 2 ml komplettem und 22,3 ml inkompletten Freund's Adjuvans. Vor und während der Behandlung wurden den Tieren in regelmäßigen Zeitabständen Blutproben von 1 - 2 ml aus dem Ohr oder einer Schenkelvene entnommen. Das Blut wurde 2 - 3 Std. bei Zimmertemperatur stehen gelassen, anschließend 15 Min. bei 3000 U/Min. zentrifugiert, das überstehende Serum dekantiert und bis zur Antikörperbestimmung bei -20° C eingefroren.

88 Tage nach der letzten Injektion wurde die Hautsensibilität der Meerschweinchen dieser Gruppe in gleicher Weise getestet und ausgewertet wie in der Pikrylchloridgruppe. Wenige Tage danach wurden die Tiere getötet und mit dem Blut in gleicher Weise verfahren wie bei der Pikrylchloridgruppe.

Messung der Insulinbindung durch Meerschweinchen- seren mit der Celluloseadsorptionsmethode (44,44a).

Zur Bestimmung der Insulinbindung von Meerschweinchen-
seren wurden in ein Reagenzglas (A) 50 · 10 mm
groß zu 100 mg Cellulose MN 100 1 mE Insulin-131-Jod

($6,42 \cdot 10^{-9}$ mMol.) in einem Serum-Puffergemisch von 1 ml (0,04 m Phosphatpuffer, pH 8,0 mit 0,25 % Albuminzusatz) und 0,055 ml Hydrationswasser (0,04 m Phosphatpuffer, pH 8,0, albuminfrei) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 5 Min. geschüttelt und 12 Std. bei 4° C inkubiert. Anschließend wurde das Cellulosepulver während 3 Min. bei ca. 5000 U/Min. abzentrifugiert, 0,5 ml des Überstandes wurden in ein weiteres Reagenzglas (B) überführt. In beiden Reagenzgläsern A und B wurde die Insulin- 131 I-Jod-Aktivität im Bohrloch des Scintillationszählers gemessen. Verdoppelung der in B gemessenen Insulinmenge ergibt das im Überstand vorhandene Insulin, während das an Cellulose adsorbierte Insulin aus der Differenz der in Reagenzglas A und B gemessenen Insulinmenge erhalten wird (44a).

Die mit dieser Methode bestimmten Meßwerte zur Insulinbindung der Meerschweinchenserum vor und nach Insulinbehandlung zeigen die Abbildungen 1 - 8. Für jedes einzelne Serum wurde die Insulinbindung bei eingesetzten Serummengen von 50,10 und 1 μ l bzw. bei Seren, deren Insulinbindungsfähigkeit hoch lag, bei Serummengen von 10,1 und 0,1 μ l bestimmt.

Zur Bestimmung der Antikörperaktivität der Meerschweinchenserum wurde in der beschriebenen Versuchsanordnung die eingesetzte Insulin- 131 I-Jod-Menge von 1 mE ($6,42 \cdot 10^{-9}$ m) konstant gehalten und die Serummengen schrittweise erhöht. Trägt man die im Überstand gemessene Insulinmenge als Funktion der eingesetzten Serummenge in ein semilogarith-

misches Koordinatensystem ein, so ergibt sich eine S-förmige Titrationskurve. Bei Insulinwerten im Überstand von 30 - 80 % des eingesetzten Insulins verläuft diese Kurve annähernd linear. Aus der Titrationskurve kann für jedes Serum als "Titer" diejenige Serummenge in μl abgelesen werden, bei der 50 % des eingesetzten Insulins in der festen und 50 % in der flüssigen Phase des Adsorptionssystem vorliegen (44a).

Es wurden pro Serum Messungen bei 3 unterschiedlichen Serumkonzentrationen durchgeführt, deren Meßpunkte in den linearen Teil der Titrationskurve fielen und damit die graphische Ermittlung des "Titers" gestatteten.

Bei Bestimmung der Insulinbindung eines einzelnen Serums wurden z.B. in die Reagenzgläser A_1 , A_2 , A_3 nach Einwiegen von 100 mg Cellulosepulver Insulin, Puffer und Serum nach folgendem Schema (44a) einpipettiert:

	A_1	A_2	A_3
Phosphatpuffer (Hydratationswasser)	55 μl	55 μl	55 μl
Phosphatpuffer und Serumalbumin	850 μl	890 μl	899 μl
Rinderinsulin 131-J Serumalbumin u. Phosphatp.	100 μl	100 μl	100 μl
Cellulosepulver MN 100	100 mg	100 mg	100 mg
Meerschweinchenserum	50 μl	10 μl	1 μl

Blutzuckermessungen an den Immunmeerschweinchen.

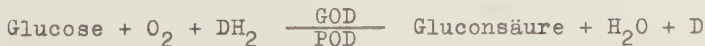
Bei allen 37 Meerschweinchen wurden in zunächst halbwöchentlichen Abständen, später nur noch jede Woche einmal Blutzuckerkontrollen durchgeführt. Dazu wurde jedem Tier 0,1 ml Blut aus dem Ohr in eine vorher mit Heparin benetzte Pipette entnommen. Das Blut wurde durch Einblasen in Perchlorsäurelösung enteiweißt, der Blutzucker wurde nach der Gluoxydase/Peroxydase-Methode zur Bestimmung der "wahren Glucose" (Farbtest der Fa. C.F. Boehringer u.Sohn GmbH, Mannheim) ermittelt. Das Enzym Glucose-Oxydase (GOD) katalysiert die Oxydation von β -D-Glucose, das weiter mit Wasser zu Gluconsäure reagiert:



Das dabei entstehende Wasserstoffperoxyd (H_2O_2) wird in gekoppelter "Indikatorreaktion" weiter umgesetzt. H_2O_2 oxydiert unter enzymatischer Katalyse durch Peroxydase (POD) den Wasserstoffdonator " DH_2 " (o-Dianisidin), der dabei in den rotbraunen Farbstoff "D" übergeht.



Die Gesamtgleichung heißt dann:



Das oxydierte Dianisidin ist in diesem System die Meßgröße und wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 436 $\mu\mu$ gemessen. Der Blutzuckergehalt der Blutproben wurde daraus in mg/% errechnet.

Wie Kontrollversuche zeigten, ist die Benutzung von Heparin-benetzten Pipetten ohne meßbaren Einfluß auf die Genauigkeit der Blutzuckermessung.

Bestimmung der Blutzuckerwirksamkeit von Antiinsulin- Meerschweinchenseren an der Maus.

Die Seren der Meerschweinchen der Pikrylchlorid- und der Freund's Adjuvansgruppe wurden in einem biologischen Test auf ihre Blutzuckerwirksamkeit untersucht. Die glykämische Aktivität der Seren wurde nach der Methode von Moloney und Coval (59) und Robinson und Wright (65) an der Maus gemessen.

Die Mäuse blieben einige Stunden vor dem Versuch in einem gut temperierten Raum ohne Nahrung. Die Applikation von Antiinsulin-Meerschweinchenseren erfolgte durch intraperitoneale Injektion an einer Stelle in der Mitte zwischen Symphyse und Xiphoid. Jede Maus wurde nur einmal verwendet und danach geopfert.

Die Blutentnahme zur Blutzuckerbestimmung erfolgte vor der Seruminjektion, um den Ausgangswert des Blutzuckers zu bestimmen, und 30, 60, 90 und 120 Min. nach der Injektion, um die Veränderungen des Blutzuckers über einen Zeitraum von 2 Std. zu kontrollieren. Zur Blutentnahme (0,1 ml Blut) wurden mit Heparin benetzte Pipetten verwendet und der Blutzucker nach der enzymatischen Methode (s.o.) bestimmt. Die Blutzuckerwirksamkeit der Meerschweinchenseren wurde an 3 Mäusegruppen untersucht, denen jeweils unterschiedliche Serummengen (0,1; 1,0 und 3 ml Serum) injiziert wurden.

Als Kontrollen dienten:

1. Mäuse, die ohne Seruminjektion blieben,
2. Mäuse, die physiologische Kochsalzlösung erhielten,
3. Mäuse, die verschiedene Mengen frischen und gealterten Meerschweinchenserums erhielten, und zwar von nicht behandelten Meerschweinchen.

Die ermittelten Blutzuckerwerte wurden in ein einfaches

Koordinatensystem eingetragen, in dem die Zeit zwischen der ersten und fünften Blutabnahme in Minuten als Abszisse und die Blutzuckerwerte in mg/% als Ordinate fungierten. Der Blutzuckerwert vor der Seruminjektion wurde in den Nullpunkt gelegt. Blutzuckerwerte, die bei den weiteren Messungen darüber lagen, wurden als positiv, Werte, die darunter lagen, als negativ aufgezeichnet.

Korrelationskurve und Berechnung des Bestimmtheitsmaßes.

Die insulinbindende Fähigkeit der Antiinsulin-Meerschweinchenserum, die mit der Celluloseadsorptionsmethode nach Kerp und Steinhilber (44,44a) ermittelt wurde, und die Blutzuckerwirksamkeit der gleichen Seren an der Maus wurden miteinander verglichen. Zur graphischen Darstellung der Verhältnisse diente ein Koordinatensystem, auf dessen Abszisse die insulinbindende Kapazität, der "Titer", logarithmisch und auf dessen Ordinate die hyperglykämieerzeugende Aktivität der Meerschweinchenserum aufgetragen wurde. Als Maß der hyperglykämieerzeugenden Aktivität wurde das Flächenintegral unter den an der Maus gewonnenen Blutzuckerkurven ausgemessen. Dabei wurden negative Flächenintegrale nach unten, positive nach oben in das Koordinatensystem eingezeichnet.

Um für die Abhängigkeit der Aktivität vom "Antikörpertiter" ein Maß zu finden, wurde die Berechnung des Bestimmtheitsmaßes durchgeführt (nach A. Linder, Statistische Methoden, 1957, 2. Aufl.). Die Berechnung des Bestimmtheitsmaßes geht davon aus, daß zu jedem Wert x im allgemeinen mehrere y Werte gehören. Besteht eine streng lineare Abhängigkeit zwischen x und y , so liegen alle y Werte auf der "Regressionsgeraden". Im

allgemeinen streuen die y Werte jedoch mehr oder weniger um die "Regressionsgerade". Man kann nun das Bestimmtheitsmaß errechnen, indem man ermittelt, welchen Anteil die Streuung der Punkte der "Regressionsgeraden" von der gesamten Streuung der Werte y_i ausmacht. Das Bestimmtheitsmaß ist definiert als:

$$B = \frac{s_{xy}^2}{s_x^2 \cdot s_y^2}$$

$$\text{wo } s_{xy} = \frac{1}{N-1} \cdot \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x}) y_i ,$$

$$s_x^2 = \frac{1}{N-1} \cdot \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 \quad \text{und}$$

$$s_y^2 = \frac{1}{N-1} \cdot \sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2$$

x_i und y_i = Einzelwerte von x und y,

$\bar{x}$ und $\bar{y}$ = Durchschnittswerte von x und y,

N = Anzahl der Einzelwerte.

Liegen alle Punkte auf der "Regressionsgeraden", so wird $B = 1$. Es herrscht dann streng lineare Abhängigkeit zwischen x und y. Besteht keinerlei Abhängigkeit der Werte y von denen von x, so wird $B = 0$. Das Bestimmtheitsmaß gibt an, welcher Anteil der Streuung von y sich aus der Veränderung von x erklären läßt.

ERGEBNISSE

Ungefähr eine Woche nach Versuchsbeginn zeigten einzelne Tiere der Pikrylchloridgruppe um die Injektionsstellen Rötungen der Haut, die übrigen Tiere erst nach 2 - 3 Wochen. Die Hautrötungen erwiesen sich während des Versuchs nicht als konstant, sondern waren an- und abschwellend. Die Injektionsstellen bildeten sich nach wenigen Tagen regelmäßig zu erhabenen oder nur tastbaren Knötchen von harter Konsistenz und ungefähr Linsengröße um, wobei die umgebende Rötung schwächer wurde.

Die Prüfung der Hautreaktionen dieser Tiere gegen Insulin einige Wochen nach der letzten Injektion ergab Unterschiede von Tier zu Tier. So variierte die Größe des geröteten Hautbezirks 15 Min. nach Antigeninjektion von Tier zu Tier zwischen negativ und einer Ausdehnung von 298 mm^2 , die Stärke des sich nach 48 Std. bildenden Knötchens zwischen negativ und sehr stark positiv (s. Abb. 1 - 5). Die durchschnittliche Größe der Sofortreaktion betrug bei den Tieren der Pikrylchloridgruppe 144 mm^2 und die Stärke der Reaktion vom verzögerten Typ war im Durchschnitt einfach positiv.

Starken Schwankungen unterlag der im Laufe der Immunisierung regelmäßig bestimmte Insulinantikörper "titer". Fast regelmäßig ließ sich wenige Wochen nach Beginn der Antigeninjektionen ein deutlicher "Titer" nachweisen, der nach Absetzen der Antigengabe, bei einigen Tieren auch noch während der Behandlung, wieder auf niedrige Werte abfiel.

Nach Höhe und Verlauf des "Titters" lassen sich in dieser Pikrylchloridgruppe 4 verschiedene Reaktionstypen unterscheiden:

Reaktionstyp 1: konstant ansteigender "Titer", der nach Absetzen der Antigeninjektionen schnell oder langsam absinkt

Abb. 2 Nr. 8, 9, 10

" 3 " 13

" 4 " 16

" 5 " 21

Reaktionstyp 2: "Titer", die stark variieren, noch während der Antigeninjektionen absinken und wieder ansteigen

Abb. 1 Nr. 1, 3, 4, 5

" 2 " 7, 11

" 3 " 12, 14

" 4 " 17

Reaktionstyp 3: "Titer", die noch während der Antigeninjektionen absinken und nicht wieder ansteigen

Abb. 1 Nr. 2, 6

Reaktionstyp 4: "Versager", d.h.

- a) Tiere, deren Seren sich im "Titer" nicht von normalen Meerschweinchen-seren unterscheiden,
- b) Tiere, deren Seren während des ganzen Versuchs einen, verglichen mit den übrigen der Gruppe, nur sehr geringen "Titer" haben und
- c) Tiere, die einen nachweisbaren "Titer" erst Wochen nach der ersten

Antigeninjektion aufwiesen.

Abb. 3 Nr. 15

" 4 " 18, 19, 20

" 5 " 24, 25

Eine besondere Gruppe bilden die 5 Kontrolltiere. Es war beabsichtigt, diese Tiere während des ganzen Versuchs nur mit Pikrylchlorid unter Ausschluß von Antigen zu behandeln. Durch ein Versehen wurde die Pikrylchloridlösung, mit der diese Tiere sensibilisiert wurden, etwa 6 Wochen nach Versuchsbeginn mit Insulin verunreinigt, so daß diese Tiere zwar später, aber in gleicher Weise wie die übrigen Seren mit deutlichem "Titer" lieferten.

Wenn man den höchsten von jedem einzelnen Tier dieser Gruppe erreichten "Titer" betrachtet, so schwankt er zwischen einer Größe von 200 μ l und 1 μ l. Der durchschnittliche Wert dieser erreichten "Titermaxima" liegt in dieser Pikrylchloridgruppe bei 26,1 μ l.

Die regelmäßig durchgeführten Blutzuckerkontrollen ließen bei keinem Tier hyper- oder hypoglykämische Werte erkennen. Hyperglykämische Werte bis zu 180 mg/% (s. Abb. 4, Tier Nr. 19) blieben Einzelbeobachtungen.

3 Tiere starben einige Wochen nach Versuchsbeginn. In den Seren dieser Tiere (Tier Nr. 15, 18, 19) ließ sich ein nur sehr geringer Insulinantikörper "titer" nachweisen. Die übrigen Tiere blieben gesund und vergrößerten ihr Gewicht dem Wachstum entsprechend regelmäßig.

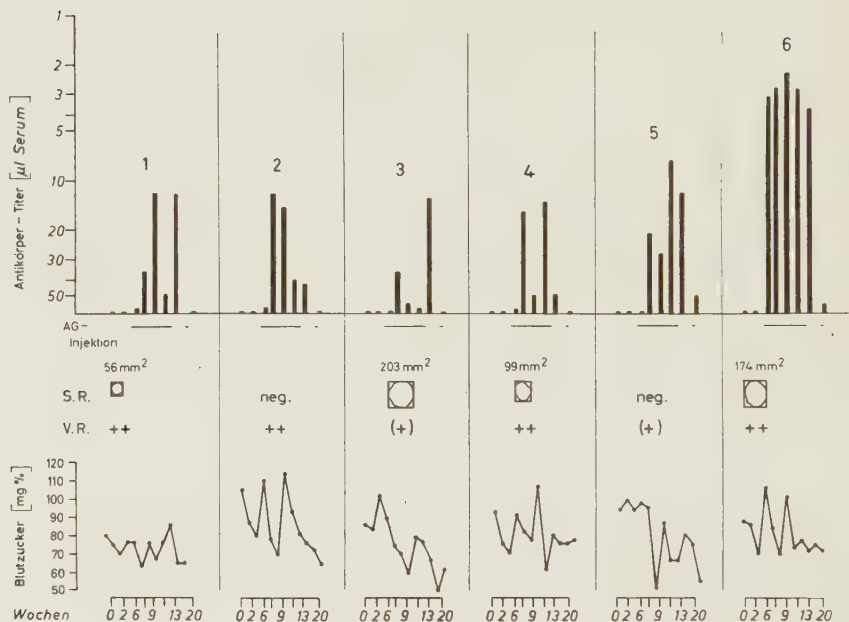


Abb. 1

Behandlung mit Pikrylchlorid und Insulin

Die Abb. zeigt von oben nach unten:

Insulinbindung als "Titer" der Meerschweinchen-
 sere angegeben,
 Zeitpunkt der Antigengabe,
 Stärke der Hautreaktion vom Soforttyp (S.R.),
 Stärke der Hautreaktion vom verzögerten Typ (V.R.),
 Blutzuckerwerte der Meerschweinchen im Verlauf des
 Versuchs,
 Dauer des Versuchs in Wochen,
 Tier Nr. 5 ist ein Kontrolltier.

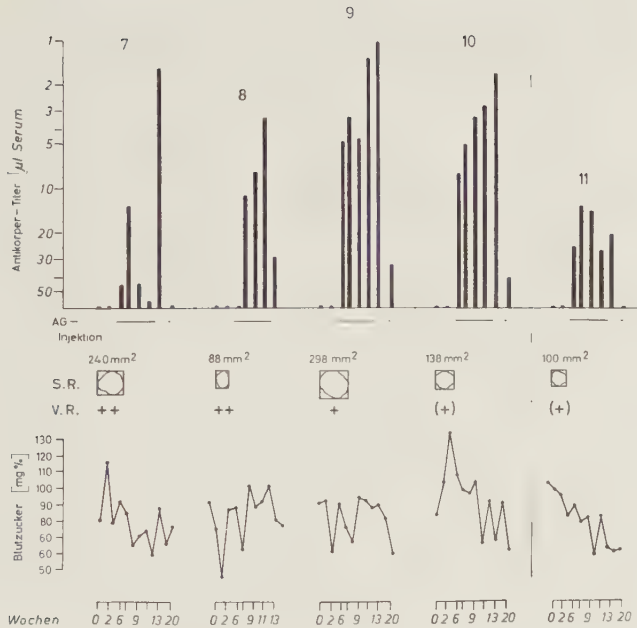


Abb. 2

Behandlung mit Pikrylchlorid und Insulin

Die Abb. zeigt von oben nach unten:

Insulinbindung als "Titer" der Meerschweinchen-
seren angegeben,
Zeitpunkt der Antigengabe,
Stärke der Hautreaktion vom Soforttyp (S.R.),
Stärke der Hautreaktion vom verzögerten Typ (V.R.),
Blutzuckerwerte der Meerschweinchen im Verlauf des
Versuchs,
Dauer des Versuchs in Wochen,
Tier Nr. 8 ist ein Kontrolltier.

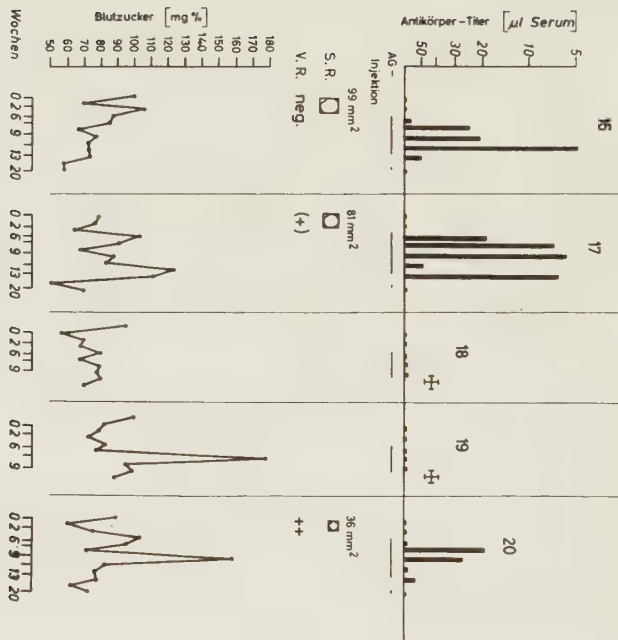


Abb. 3

Behandlung mit Pikrylchlorid und Insulin

Die Abb. zeigt von oben nach unten:

Insulinbindung als "Titer" der Meerschweinchen-
seren angegeben,
Zeitpunkt der Antigengabe,
Stärke der Hautreaktion vom Soforttyp (S.R.),
Stärke der Hautreaktion vom verzögerten Typ (V.R.),
Blutzuckerwerte der Meerschweinchen im Verlauf des
Versuchs,
Dauer des Versuchs in Wochen,
Tier Nr. 13 ist ein Kontrolltier.

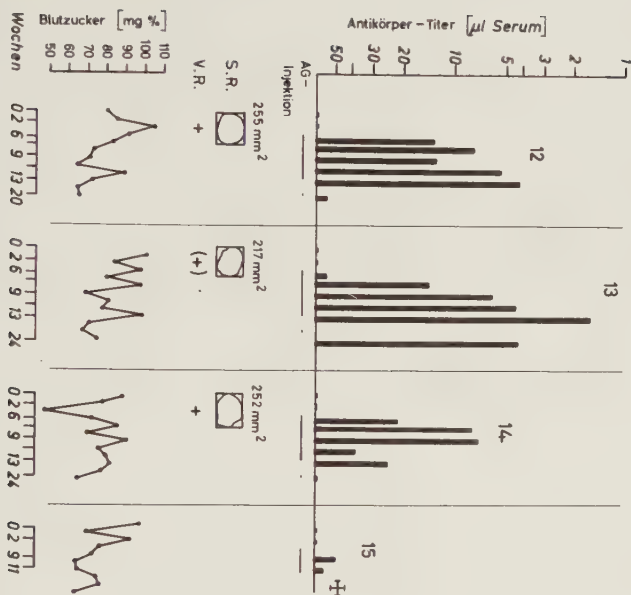


Abb. 4

Behandlung mit Pikrylchlorid und Insulin

Die Abb. zeigt von oben nach unten:

Insulinbindung als "Titer" der Meerschweinchen-
seren angegeben,
Zeitpunkt der Antigengabe,
Stärke der Hautreaktion vom Soforttyp (S.R.)
Stärke der Hautreaktion vom verzögerten Typ (V.R.),
Blutzuckerwerte der Meerschweinchen im Verlauf des
Versuchs.
Dauer des Versuchs in Wochen.

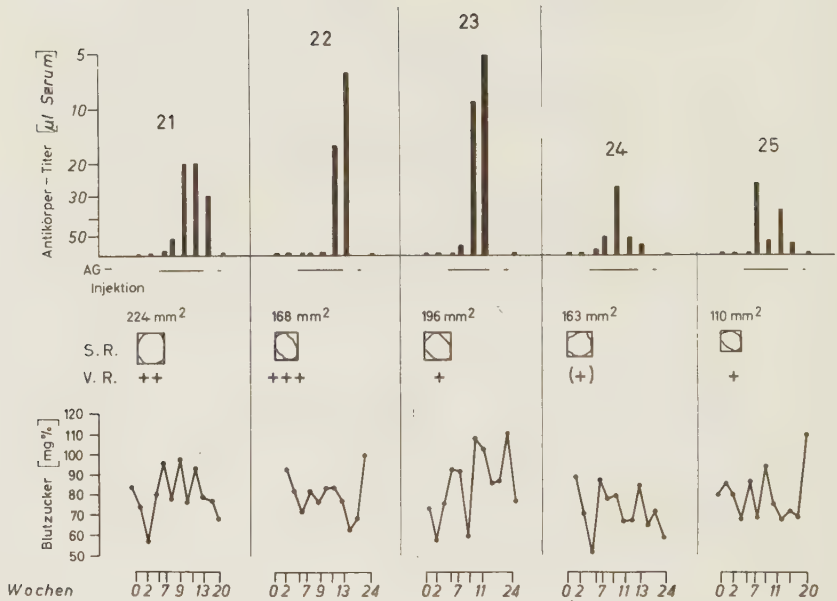


Abb. 5

Behandlung mit Pikrylchlorid und Insulin

Die Abb. zeigt von oben nach unten:

Insulinbindung als "Titer" der Meerschweinchen-
 seren angegeben,
 Zeitpunkt der Antigengabe,
 Stärke der Hautreaktion vom Soforttyp (S.R.),
 Stärke der Hautreaktion vom verzögerten Typ (V.R.),
 Blutzuckerwerte der Meerschweinchen im Verlauf des
 Versuchs,
 Dauer des Versuchs in Wochen,
 Die Tiere Nr. 22 und 23 sind Kontrolltiere.

Alle 12 Tiere der Freund's Adjuvansgruppe vertrugen die erste Injektion, bei der ihnen 8 E Insulin in Adjuvansemulsion zugeführt wurden, ohne Anzeichen hypoglykämischer Reaktionen. Die weiteren Injektionen, die jedesmal in die gleiche Stelle des Nackens gegeben wurden, ließen nach einigen Wochen derbe, in der Subcutis liegende etwa kirschgroße, festweiche Knoten entstehen. Die Knoten abszedierten regelmäßig und entleerten oft mehrere Tage lang gelb-grünen Eiter. Nach Absetzen der Behandlung heilten die Abszesse ohne Komplikationen aus. Der Allgemeinzustand der Tiere blieb trotz dieser eingreifenden Immunisierungsmethode auffallend gut, es ließ sich eine konstante Gewichtszunahme verzeichnen und kein Tier verstarb unter der Behandlung.

Die Prüfung der Hautsensibilität dieser Tiere gegen Insulin einige Wochen nach der letzten Injektion verlief bei fast allen Tieren positiv. Die Größe des geröteten Hautbezirks 15 Min. nach Antigeninjektion variierte zwischen negativ und 323 mm^2 , und die Stärke des sich nach 48 Std. bildenden Knötchens zwischen negativ und sehr stark positiv. Die durchschnittliche Größe der Sofortreaktion betrug bei den Tieren dieser Gruppe 211 mm^2 und die durchschnittliche Stärke der verzögerten Reaktion war stark positiv.

Die während des Versuchs regelmäßig bestimmten Insulinantikörper"titer" fallen durch ihren einheitlichen Verlauf auf. Die Seren aller Tiere weisen schon 3 Wochen nach der ersten Antigen-

injektion einen deutlichen "Titer" auf. Dieser "Titer" erreicht bei einigen Tieren eine trotz weiterer Antigengabe nicht überschrittene Höhe. Nach Absetzen der Insulininjektionen bleibt der "Titer" noch über einige Wochen deutlich nachweisbar. In Höhe und Verlauf des "Titters" lassen sich zwei verschiedene Reaktionstypen unterscheiden:

1. Reaktionstyp: "Titer", die noch während der Antigeninjektionen eine für das Tier nicht zu überschreitende Höhe erreicht haben; auf weitere Antigengaben resultiert "Titersenkung".

Abb. 6 Nr. 27

" 7 " 31

" 8 " 34, 37

2. Reaktionstyp: "Titer", die während der Antigeninjektionen ansteigen, und die erst nach Absetzen der Injektionen absinken.

Abb. 6 Nr. 26, 28, 29

" 7 " 30, 32, 33

" 8 " 36, 38

Wenn man den höchsten von jedem Tier erreichten "Titer" betrachtet, so schwankt er zwischen einer Größe von 3,3 μ l und 0,01 μ l. Der durchschnittliche Wert dieser erreichten "Titermaxima" liegt in dieser Freund's Adjuvansgruppe bei 0,84 μ l. Die regelmäßig durchgeführten Blutzuckerkontrollen ließen bei keinem Tier konstante hyper- oder hypoglykämische Werte erkennen. Hyperglykämische Werte bis zu 140 mg/% blieben Einzelbeobachtungen.

Zur besseren Übersicht seien noch einige der wichtigsten Daten der beiden Gruppen einander gegenübergestellt:

	"Titer"maximum der einzelnen Tiere im Bereich von:	durchschnittl. "Titer"maximum der Gruppe:
Pikrylchlorid- gruppe n = 25	200-1 μ l	26,1 μ l
Freund's Adjuvans- gruppe n = 12	3,3-0,01 μ l	0,84 μ l

Tabelle 1

	durchschnittl. Größe der Sofortre- aktion	durchschnittl. Größe der verzögerten Reaktion
Pikrylchlorid- gruppe n = 25	144 mm ²	positiv
Freund's Adjuvans- gruppe n = 12	211 mm ²	stark positiv

Tabelle 2

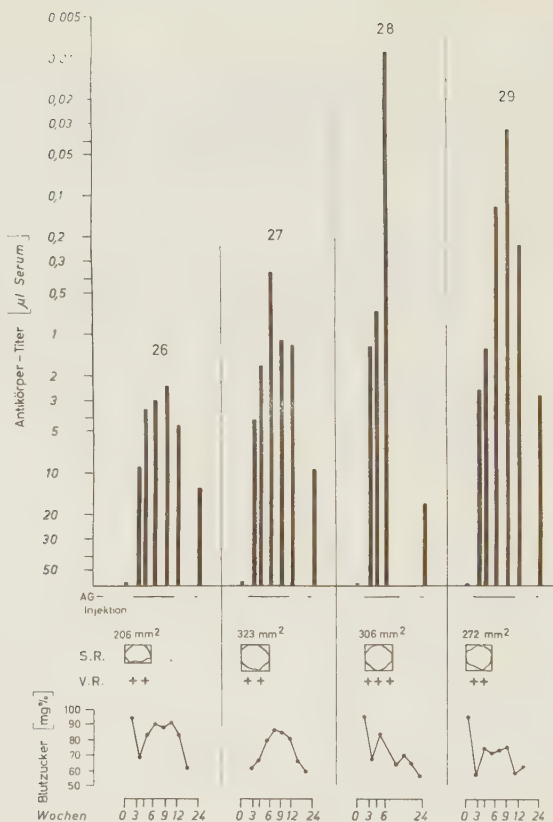


Abb. 6

Behandlung mit Insulin in Freund's Adjuvans

Die Abb. zeigt von oben nach unten:

Insulinbindung als "Titer" der Meerschweinchen-
seren angegeben,
Zeitpunkt der Antigengabe,
Stärke der Hautreaktion vom Soforttyp (S.R.),
Stärke der Hautreaktion vom verzögerten Typ (V.R.),
Blutzuckerwerte der Meerschweinchen im Verlauf des
Versuchs,
Dauer des Versuchs in Wochen.

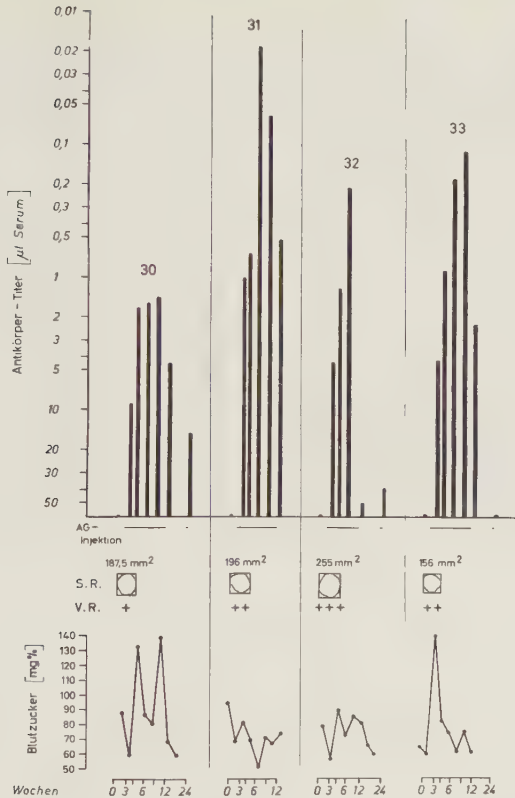


Abb. /

Behandlung mit Insulin in Freund's Adjuvans

Die Abb. zeigt von oben nach unten:

Insulinbindung als "Titer" der Meerschweinchen-
seren angegeben,
Zeitpunkt der Antigengabe,
Stärke der Hautreaktion vom Soforttyp (S.R.),
Stärke der Hautreaktion vom verzögerten Typ (V.R.),
Blutzuckerwerte der Meerschweinchen im Verlauf des
Versuchs,
Dauer des Versuchs in Wochen.

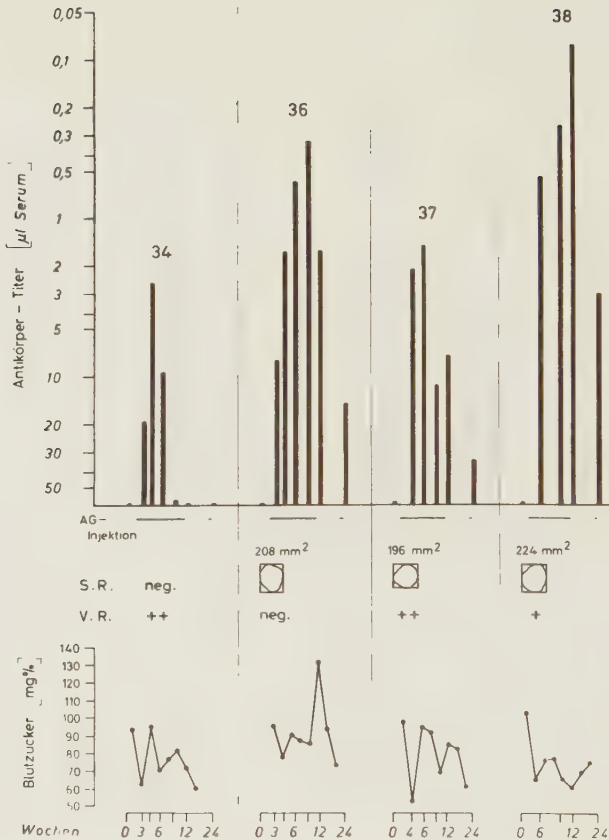


Abb. 8

Behandlung mit Insulin in Freund's Adjuvans

Die Abb. zeigt von oben nach unten:

Insulinbindung als "Titer" der Meerschweinchen-
seren angegeben,
Zeitpunkt der Antigengabe,
Stärke der Hautreaktion vom Soforttyp (S.R.),
Stärke der Hautreaktion vom verzögerten Typ (V.R.),
Blutzuckerwerte der Meerschweinchen im Verlauf des
Versuchs,
Dauer des Versuchs in Wochen.

Die von den Meerschweinchen beider Gruppen gesammelten Seren wurden in einem biologischen Test, wie in der Methodik (s.o.) ausführlich erläutert, auf ihre Blutzuckerwirksamkeit an der Maus hin untersucht. Es wurde dabei vor allem geprüft, von welchen "Titer" an die Antiinsulinseren eine spezifische Wirkung mit Sicherheit erkennen lassen, und ob Seren mit höheren "Titern" auch vergleichsweise stärkere Hyperglykämien an der Maus hervorrufen. Die Spezifität oder Unspezifität einer Blutzuckerkurve geht aus den von Moloney und Coval (59) und Robinson und Wright (65) u.a. gemachten Beobachtungen hervor, daß die Wirkung der insulinneutralisierenden Meerschweinchenseren vor allem in einem Blutzuckeranstieg wenige Minuten nach Injektion des Serums besteht, dem ein mehr oder weniger deutlich ausgebildetes Plateau der Blutzuckerkurve und ein Blutzuckerabfall folgt.

An 14 Mäusen wurde die Wirkung von 0,1 ml Anti-insulinmeerschweinchenserum, intraperitoneal injiziert, untersucht. Dabei kamen Seren mit einem "Titer" von 24,5 μ l bis 0,0092 μ l zur Anwendung. Seren mit einem Antikörper"titer" bis zu 2,1 μ l zeigen keine regelmäßigen Blutzuckeränderungen. Erst von einem "Titer" von 1,55 μ l ab lassen sich regelmäßige hyperglykämische Reaktionen der Mäuse nachweisen. Verlauf und Höhe der Blutzuckerkurven sind vom Antikörper"titer" der injizierten Meerschweinchenseren abhängig.

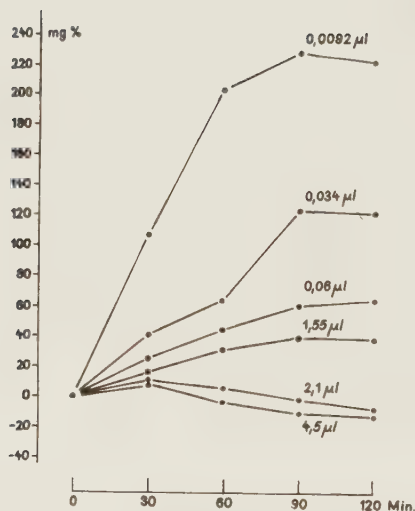


Abb. 9

Blutzuckerungsverlauf bei Mäusen nach Injektion von 0,1 ml Antiinsulinmeerschweinchenserum i.p.

Auf der Ordinate ist die Veränderung des Blutzuckers gegenüber dem Ausgangswert in mg% angegeben, auf der Abszisse die Zeit in Minuten nach intraperitonealer Seruminjektion. Die Antikörper"titer" sind für die jeweils injizierten Seren eingetragen.

Nach Injektion von Seren mit einem "Titer" von 1,55 - 0,06 μ l erreicht der Blutzuckeranstieg meist schon nach 60 - 90 Minuten den Höhepunkt und fällt danach ab. Seren mit einem "Titer" von 0,034 - 0,009 μ l bewirken einen Blutzuckeranstieg, der seinen Gipfel erst nach 90 - 120 Minuten erreicht hat.

Wie der Verlauf ist auch die erreichte Höhe des Blutzuckers deutlich vom Antikörper"titer" der Seren abhängig. Seren mit einem "Titer" von 1,55 - 0,35 μ l bewirken einen Blutzuckeranstieg bis zu 70 mg/% über den Ausgangswert, Seren mit einem "Titer" von 0,12 - 0,024 μ l einen Anstieg bis zu 130 mg/% über den Ausgangswert, das Serum mit dem höchsten "Titer" von 0,009 μ l sogar einen Anstieg bis zu 227 mg/% über den Ausgangswert (Abb.9).

"Titer" der Meer-schweinchenanti-insulinseren	1,55-0,35	0,12-0,024	0,009	Kontrollen
verw. Serum-mengen	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1-3 ml
höchster Blut-zuckeranstieg über den Aus-gangswert	70 mg/%	130 mg/%	227 mg/%	49 mg/%
höchster durch-schnittlicher Blutzuckeran-stieg über den Ausgangswert	48,5 mg/%	120 mg/%	kein Anstieg	

Tabelle 3

Die Tabelle stellt die wichtigsten Daten der mit 0,1 ml Antiinsulin-Meerschweinchenserum behandelten Mäuse zusammen. "Kontrollen" bedeuten Normalseren von nicht insulinbehandelten Meerschweinchen.

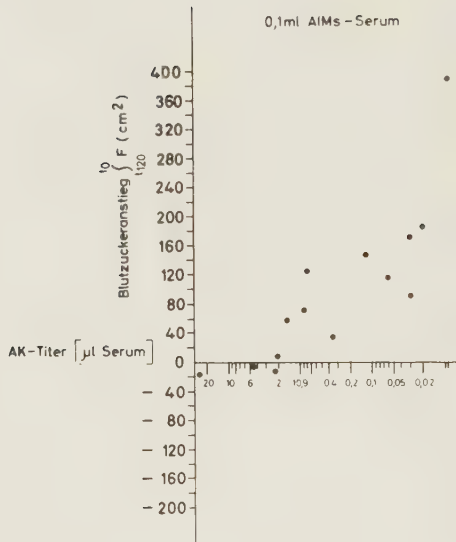


Abb. 10

Flächenwerte der Blutzuckerkurven nach i.p. Injektion von 0,1 ml Antiinsulinmeerschweinchenserum in Abhängigkeit vom Antikörper"titer" der verwendeten Seren.

Ordinate: Flächenwerte unter den Blutzuckerkurven von 0 - 120 Min. in cm^2 (negative Werte entsprechen Flächen unter den Blutzuckerkurven, die niedriger als der Ausgangswert liegen).

Abszisse: Antikörper"titer" der verwendeten Antiinsulinmeerschweinchenserum (AIMS-Serum)

Um die mit der Celluloseadsorptionsmethode gemessenen "Titer" mit dem an der Maus bestimmten Blutzucker Verlauf zu vergleichen, wurden verschiedene Möglichkeiten der Auswertung der Blutzuckerkurven erwogen. Die geringste Verfälschung der Kurven ergab die Errechnung des Flächenintegrals von 0 bis 120 Minuten unter der gesamten Blutzuckerkurve. Die Darstellung der Flächenintegrale der Blutzuckerkurven als Funktion des "Titters" veranschaulicht (Abb. 10), daß sich bis zu einem "Titer" von 2 μ l keine Abhängigkeit der beiden Größen nachweisen läßt. Erst bei einem "Titer" von 0,9 μ l und darüber wird eine Beziehung zwischen "Titer" und Flächenintegral deutlich.

Die Errechnung des Bestimmtheitsmaßes (B), das angibt, welchen Anteil der Streuung von y (Flächenintegrale der Blutzuckerkurven) sich aus der Veränderung von x ("Titer") durch lineare Regression erklären läßt, wurde nach der in der Methodik angegebenen Formel

$$B = \frac{s^2_{xy}}{s^2_x \cdot s^2_y}$$

errechnet. Dabei ergaben sich in dieser Versuchsgruppe für $s^2_{xy} = 93\ 700$

$$s^2_x = 11\ 900$$

$$s^2_y = 42,7$$

Danach ist $B = 0,19$. Dieser Wert läßt sich so deuten, daß 19 % der Streuung der Flächenwerte der Blutzuckerkurven sich aus der Veränderung des "Titters" durch lineare Regression erklären lassen. Zur Beurteilung

der Korrelation der beiden Größen wurde die Abweichung des Bestimmtheitsmaßes von 0 geprüft. (Nach A. Linder, Statistische Methoden, 3. Aufl.) Die Abweichung von 0 kann für $B = 0,19$ bei einem Freiheitsgrad von $n = N-2=12$ zur Sicherheitschwelle $P = 0,05$ nicht gesichert werden. Mit anderen Worten: Es besteht in dieser Versuchsanordnung (0,1 ml Antiinsulinserum i.p.) statistisch keine signifikante Korrelation zwischen den Flächenwerten der Blutzuckerkurven und dem "Titer" der verwendeten Antiinsulinseren.

An 23 Mäusen wurde die Wirkung von 1 ml Antiinsulin-Meerschweinchenserum untersucht. Dabei kamen Seren mit einem "Titer" von 1000 μ l bis 0,017 μ l zur Anwendung. Injektion von Seren mit einem "Titer" bis zu 15 μ l bewirken keine regelmäßigen Blutzuckeränderungen. Erst von einem "Titer" höher als 14,5 μ l an lassen die Seren eine spezifische Wirkung erkennen. Dabei bewirken Seren mit einem "Titer" von 14,5 - 3 μ l einen Blutzuckeranstieg, der nach 60 - 90 Minuten seinen Höhepunkt erreicht hat. Nach Injektion von Seren mit einem "Titer" von 1,8 - 0,017 μ l ist das Maximum der Hyperglykämie nach 2 Stunden noch nicht erreicht.

Auch die Höhe der Blutzuckeränderung ist wie in der vorigen Versuchsgruppe vom "Titer" der Seren abhängig. Seren mit einem "Titer" zwischen 14,5 und 3 μ l bewirken eine Hyperglykämie bis zu 92 mg% über den Ausgangswert, Seren mit einem

"Titer" zwischen 1,8 und 0,017 μ l eine Hyperglykämie bis zu 191 mg/% über den Ausgangswert.

"Titer" der Meerschweinchenanti-insulinseren	14,5-3 μ l	1,8-0,017 μ l	Kontrollen
verw. Serum-mengen	1 ml	1 ml	0,1-3 ml
höchster Blutzuckeranstieg über den Ausgangswert	92 mg/%	191 mg/%	49 mg/%
höchster durchschnittlicher Blutzuckeranstieg über den Ausgangswert	68,6 mg/%	142 mg/%	kein Anstieg

Tabelle 4

Die Tabelle stellt die wichtigsten Daten der mit 1 ml Antiinsulin-Meerschweinchenserum behandelten Mäuse zusammen. "Kontrollen" bedeuten Normalseren von nicht insulinbehandelten Meerschweinchen.

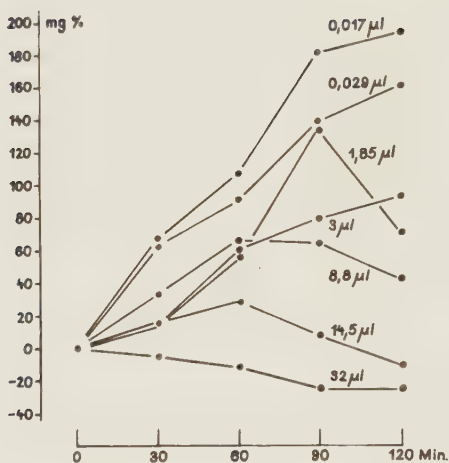


Abb. 11

Blutzuckerungsverlauf bei Mäusen nach Injektion von 1 ml Antiinsulinmeerschweinchen Serum i.p.

Auf der Ordinate ist die Veränderung des Blutzuckers gegenüber dem Ausgangswert in mg% angegeben, auf der Abszisse die Zeit in Minuten nach intraperitonealer Seruminjektion. Die Antikörper"titer" sind für die jeweils injizierten Seren eingetragen.

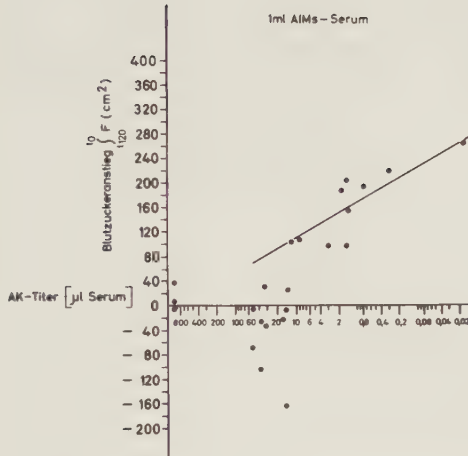


Abb. 12

Flächenwerte der Blutzuckerkurven nach i.p. Injektion von 1 ml Antiinsulinmeerschweinchen血清 in Abhängigkeit vom Antikörper"titer" der verwendeten Seren.

Ordinate: Flächenwerte unter den Blutzuckerkurven von 0 - 120 Min. in cm^2 (negative Werte entsprechen Flächen unter den Blutzuckerkurven, die niedriger als der Ausgangswert liegen).

Abszisse: Antikörper"titer" der verwendeten Antiinsulinmeerschweinchen血清 (AIMS-Serum)

Die Darstellung der Flächenintegrale der Blutzuckerkurven als Funktion des "Titters" veranschaulicht, daß sich bis zu einem "Titer" von 15 µl keine Abhängigkeit der beiden Größen nachweisen läßt. Erst von einem "Titer" von 14,5 µl (s. Abb. 12) an wird eine Beziehung zwischen "Titer" und Flächenintegral deutlich.

Die Errechnung des Bestimmtheitsmaßes ergab für diese Versuchsgruppe folgende Werte:

$$s^2_{xy} = 2\,240\,000$$

$$s^2_x = 14\,243$$

$$s^2_y = 310,6$$

Danach ist $B = 0,51$. Dieser Wert läßt sich so deuten, daß 51 % der Streuung der Flächenwerte der Blutzuckerkurven sich aus der Veränderung des "Titters" durch lineare Regression erklären lassen. Zur Beurteilung der Korrelation der beiden Größen wurde die Abweichung des Bestimmtheitsmaßes von 0 geprüft. Die Abweichung von 0 kann für $B = 0,51$ bei einem Freiheitsgrad von $n = N-2 = 21$ zur Sicherheitsschwelle $P = 0,001$ gesichert werden. Es besteht, mit anderen Worten, eine statistisch voll gesicherte einfache lineare Abhängigkeit zwischen den Flächenwerten der Blutzuckerkurven und dem Antikörper"titer" der verwendeten Antiinsulinseren.

An 13 Mäusen wurde die Wirkung von 3 ml Anti-insulin-Meerschweinchenserum untersucht. Dabei kamen Seren mit einem "Titer" von 100 μ l bis 1,5 μ l zur Anwendung. Seren mit einem "Titer" zwischen 100 und 34 μ l bewirken zwar Blutzuckeranstiege, aber ohne die für einen spezifischen Effekt typische Regelmäßigkeit des Blutzuckeranstiegs und -abfalls. Erst von einem "Titer" von 34 μ l an läßt der Verlauf der Blutzuckerkurven eine Antikörper-bedingte Hyperglykämie erkennen. Seren mit einem "Titer" zwischen 34 und 8,8 μ l bewirken Blutzuckeranstiege bis zu 52 mg/%. Der Effekt dieser Seren ist kurz und nach 60 bis 90 Minuten vorüber. Seren mit einem "Titer" zwischen 4,8 und 1,5 μ l verursachen Blutzuckeranstiege bis zu 164 mg/%. Die Wirkung dieser Seren hält etwas länger an und ist nach 120 Minuten bei einigen Seren noch nicht abgeklungen (s.Abb.13).

"Titer" der Meerschweinchenanti-insulinseren	34-8,8 μ l	4,8-1,5 μ l	Kontrollen
verw. Serum-mengen	3 ml	3 ml	0,1-3 ml
höchster Blutzuckeranstieg über den Ausgangswert	52 mg/%	164 mg/%	49 mg/%
höchster durchschnittlicher Blutzuckeranstieg über den Ausgangswert	27,5 mg/%	80 mg/%	kein Anstieg

Tabelle 5

Die Tabelle stellt die wichtigsten Daten der mit 3 ml Antiinsulin-Meerschweinchenserum behandelten Mäuse zusammen. "Kontrollen" bedeuten Normalseren von nicht insulinbehandelten Meerschweinchen.

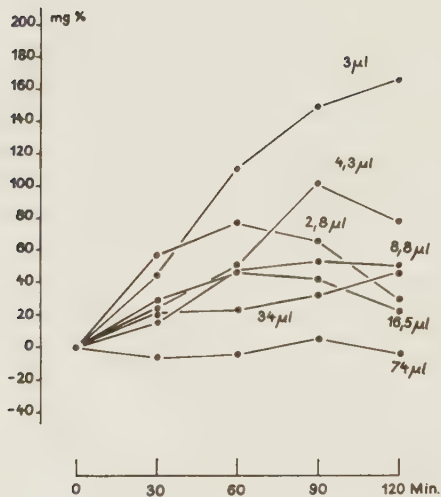


Abb. 13

Blutzuckerverlauf bei Mäusen nach Injektion von 3 ml Antiinsulinmeerschweinchen Serum i.p.

Auf der Ordinate ist die Veränderung des Blutzuckers gegenüber dem Ausgangswert in mg% angegeben, auf der Abszisse die Zeit in Minuten nach intraperitonealer Seruminjektion. Die Antikörper"titer" sind für die jeweils injizierten Seren eingetragen.

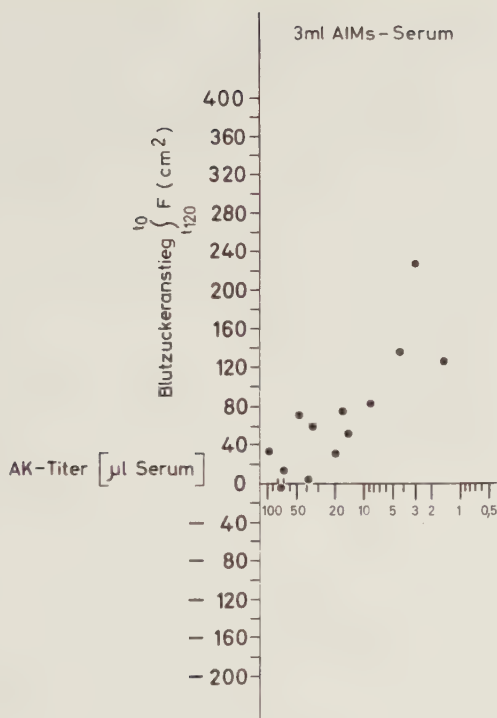


Abb. 14

Flächenwerte der Blutzuckerkurven nach i.p. Injektion von 3 ml Antiinsulinmeerschweinchen Serum in Abhängigkeit vom Antikörper"titer" der verwendeten Seren.

Ordinate: Flächenwerte unter den Blutzuckerkurven von 0 - 120 Min. in cm² (negative Werte entsprechen Flächen unter den Blutzuckerkurven, die niedriger als der Ausgangswert liegen).

Abszisse: Antikörper"titer" der verwendeten Antiinsulinmeerschweinchen Seren (AIMS-Serum)

Eine Abhängigkeit der Blutzucker-Flächenintegrale vom "Titer" der entsprechenden Seren läßt sich von einem "Titer" von 30 μ l an verdeutlichen (s. Abb. 14). Seren mit niedrigerem Antikörper"titer" entsprechen zwar zum größten Teil auch positiven Flächenintegralen, aber ohne erkennbare Beziehung beider Größen zueinander.

Die Errechnung des Bestimmtheitsmaßes ergab für diese Versuchsgruppe folgende Werte:

$$s^2_{xy} = 1\,795\,000$$

$$s^2_x = 4\,135$$

$$s^2_y = 968$$

Danach ist $B = 0,45$. Dieser Wert läßt sich so deuten, daß 45 % der Streuung der Flächenwerte der Blutzuckerkurven sich aus der Veränderung des "Titters" durch lineare Regression erklären lassen. Zur Beurteilung der Korrelation der beiden Größen wurde die Abweichung des Bestimmtheitsmaßes von 0 geprüft. Die Abweichung von 0 kann für $B = 0,45$ bei einem Freiheitsgrad von $n = N-2 = 11$ zur Sicherheitsschwelle $P = 0,01$ gerade noch gesichert werden. Es besteht, mit anderen Worten, eine statistisch noch gesicherte einfache lineare Abhängigkeit zwischen den Flächenwerten der Blutzuckerkurven und dem "Titer" der verwendeten Seren.

Vielleicht sollte noch erwähnt werden, daß die Blutzuckerverläufe nur vom "Titer" der Seren abhängig sind, und nach unseren Ergebnissen der Behandlungsmodus der Tiere, von denen sie gewonnen wurden - Pikrylchlorid oder Freund's Adjuvans -, keine Rolle spielt.

verw. Serum- mengen	0,1 ml	1 ml	3 ml
"Titer", bei dem sich die erste spez. Hyperglykämie nachweisen läßt	1,55 μ l	14,5 μ l	34 μ l

Tabelle 6

Die Tabelle soll die gefundene Abhängigkeit der hyperglykämischen Reaktion von der Menge und vom Antikörper"titer" des injizierten Antiinsulinserums verdeutlichen.

Um die Bedeutung unspezifischer Effekte, die die spezifischen Blutzuckeränderungen vortäuschen oder verfälschen können, zu ermitteln, wurden verschiedene Kontrollversuche durchgeführt.

Die Wirkung frischen Meerschweinchenserums, das in der gleichen Weise gewonnen und behandelt wurde wie die Seren der mit Insulin behandelten Meerschweinchen, wurde an 12 Mäusen getestet. Die Mäuse erhielten Serummengen von 0,1; 1,2 und 3 ml intraperitoneal. Die Tiere reagierten im allgemeinen auf die Injektion der Seren mit schwach ansteigenden oder abfallenden Blutzuckerwerten. Einzelne Tiere zeigten jedoch plötzliche Blutzuckersenkungen bis zu 46 mg% unter den Ausgangswert oder Blutzuckeranstiege bis zu 49 mg% über den Ausgangswert. Im ganzen lassen sich die Blutzuckerläufe dieser

Versuchsgruppe leicht von den spezifischen Blutzuckerkurven nach Injektion von Anti-insulinseren mit ihren regelmäßigen Anstiegen, Plateaubildungen und Abstiegen unterscheiden. Allerdings ist nur die Betrachtung einer bestimmten Anzahl von Versuchen ausschlaggebend, und nicht ein einzelner Versuch, bei dem hin und wieder unspezifische Blutzuckerreaktionen den spezifischen ähneln können. Die wichtigsten Daten dieser Gruppe sind in den auf den Seiten 37, 41 und 45 wiedergegebenen Tabellen jeweils als "Kontrollen" verwendet (s.auch Abb.15,S.53). In der Flächenberechnung der Blutzuckerkurven dieser Gruppe (s.Abb.16,2.Spalte,S.54) finden sich Werte, die zwischen 80 und -80 mm² schwanken. Es läßt sich keine Abhängigkeit zwischen der Größe der Flächenintegrale und der Menge des injizierten Serums nachweisen.

An 7 Mäusen wurde untersucht, inwieweit sich die Maßnahme der Blutabnahme und der Stich mit einer Kanüle in die Bauchhöhle der Tiere (ohne etwas zu injizieren) auf den Blutzucker auswirkt. Es zeigt sich, daß die meisten Tiere mit leichten Blutzuckererhöhungen (bis zu 40 mg% über den Ausgangswert) reagieren. Nach 60 Minuten fallen die Blutzuckerwerte ab. Im allgemeinen lassen die Kurven aber eine Regelmäßigkeit vermissen (s.Abb.15). Die Flächenintegrale der Blutzuckerkurven (Abb.16) zeigen negative und positive Werte.

An 7 Mäusen wurde die Wirkung der Injektion von 3 ml physiol. Kochsalzlösung auf den Blutzucker untersucht. Wie in den beiden vorhergehenden Kontrollversuchen ergaben sich auch hier nur leichte Schwankungen um den Ausgangswert. Die Blutzuckerkurve eines Tieres ist allerdings so regelmäßig mit einem Anstieg nach 30 Minuten auf 50 mg% über den Ausgangswert und einem 90 Minuten dauernden Abstieg auf den Ausgangswert zurück, daß sie sich nicht von einer Blutzuckerkurve mit spezifischem Verlauf nach Injektion von Antiinsulinserum unterscheiden läßt (s. auch Abb. 15, S.53). Die Flächenintegrale der Blutzuckerkurven (Abb.16, 3. Spalte, S.54) zeigen negative und positive Werte.

Ein wichtiger Befund ergab sich aus der Untersuchung gealterter Meerschweinchenseren von Tieren, die nicht mit Insulin behandelt worden waren. Diese Seren waren sehr häufig eingefroren und wieder aufgetaut worden. An 7 Mäusen wurde die Wirkung von 3 ml dieser Seren (aus einem Serumpool) geprüft. 4 Tiere zeigten nach der Injektion innerhalb von 90 Minuten einen Blutzuckeranstieg von 72 - 85 mg% über den Ausgangswert, der von einem leichten Blutzuckerabfall gefolgt war. 2 Mäuse reagierten mit einem geringeren Blutzuckeranstieg, der erst nach 120 Minuten ein Maximum von 21 bzw. 43 mg% über den Ausgangswert erreichte. Bei einem Tier wurde der Blutzucker 90 Minuten nach der In-

jektion 129 mg% über dem Ausgangswert gefunden (s.auch Abb.15,S.53). Diese, wenn auch in ihrem Ausmaß am einzelnen Tier unterschiedlichen Effekte gealterten Meerschweinchenserums nicht insulinbehandelter Tiere lassen sich von den als spezifisch gedeuteten hyperglykämischen Wirkungen von Anti-insulinseren nicht unterscheiden. Auch die Messung der in vitro-Insulinbindung dieser Seren mit der Celluloseadsorptionsmethode ergab einen "Titer" von 0,12 µl (s.auch Abb.16,S.54).

Da die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Meerschweinchenserum nur zwei- bis dreimal eingefroren und aufgetaut wurden, läßt sich bei ihnen eine solche Nebenwirkung, die bisher nur bei sehr häufig eingefrorenen und wieder aufgetauten Seren beobachtet wurde, mit Sicherheit ausschließen.

Art des injizierten Materials:	frisches Meerschweinchenserum	häufig eingefrorenes u.wieder aufgetautes Meerschweinchenserum
Größte durchschnittl.Blutzucker- veränderung unter od.über den Ausgangswert:	-3,3 mg%	+72 mg%
Art des injizierten Materials:	Einstich in die Bauchhöhle <u>ohne</u> zu injizieren	Injektion von 3 ml physiol. NaCl-Lösung in die Bauchhöhle
Größte durchschnittl.Blutzucker- veränderung unter od.über den Ausgangswert:	+13 mg%	+14 mg%

Tabelle 7

Die Tabelle zeigt die durchschnittlichen Blutzucker-
veränderungen der verschiedenen Kontrollgruppen.

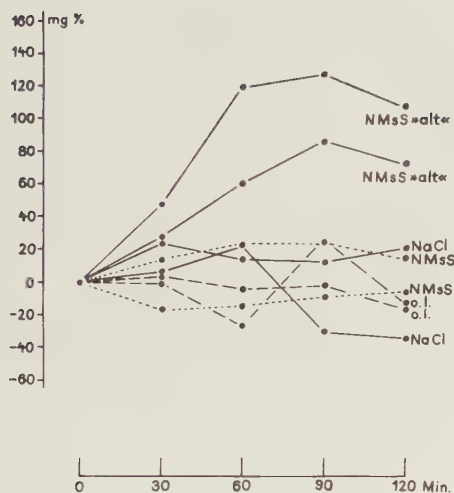


Abb. 15

Blutzuckercurven von Mäusen, denen als "Kontrolle" stark gealtertes normales Meerschweinchen Serum (NMsS "alt"), frisches normales Meerschweinchen Serum (NMsS) und physiol. NaCl-Lösung (NaCl) intraperitoneal injiziert wurde. Bei einer Tiergruppe wurde ein intraperitonealer Einstich ohne etwas zu injizieren (o.I.) gemacht.

Ordinate: Veränderung des Blutzuckers gegenüber dem Ausgangswert in mg %.

Abszisse: Zeit in Minuten nach der intraperitonealen Injektion.

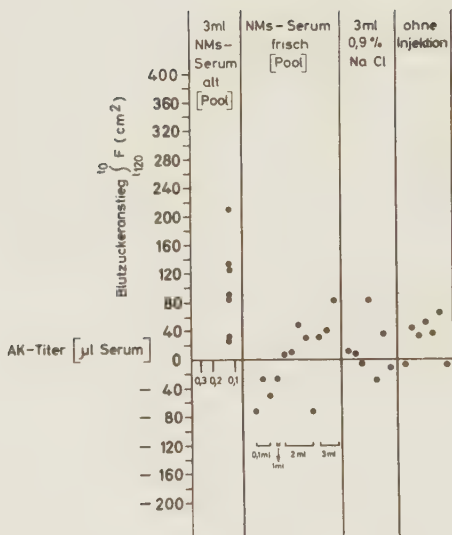


Abb. 16

Flächenwerte der Blutzuckerkurven von Mäusen, die als Kontrollen auf verschiedene Weise behandelt wurden.

Gruppe I - erste Spalte der Abbildung - erhielt 3 ml normales Meerschweinchen Serum, welches wiederholt eingefroren und wieder aufgetaut wurde;

Gruppe II - zweite Spalte - erhielt 0,1 - 3 ml frisches Serum normaler Meerschweinchen;

Gruppe III - dritte Spalte - erhielt 3 ml physiol. NaCl-Lösung;

Gruppe IV - vierte Spalte - erhielt lediglich einen intraperitonealen Einstich ohne Injektion.

Ordinate: Flächenwerte unter den Blutzuckerkurven von 0 bis 120 Minuten in mm^2 . (Negative Werte entsprechen Flächen unter den Blutzuckerkurven, die niedriger als der Ausgangswert-Blutzuckerwert vor der Seruminjektion liegen.)

Abszisse: "Titer" des gealterten Meerschweinchen Serums.

DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Mit der Celluloseadsorptionsmethode, in der oben beschriebenen Form (s. Methodik) von Kerp und Steinhilber zur Bestimmung insulinbindender Serumproteine eingeführt, gelang es, in Seren insulinbehandelter Meerschweinchen insulinbindende Proteine nachzuweisen. Die Spezifität der Celluloseadsorptionsmethode zum Nachweis insulinbindender Antikörper geht daraus hervor, daß die Meßwerte zur Insulinbindung durch Seren von Meerschweinchen vor der Insulinbehandlung in einem relativ eng abgegrenzten Bereich niedriger Bindungswerte liegen (s. "Titer"werte vor Antigeninjektion in den Abb. 1-5, S. 24-28 und Abb. 6-8, S. 32-34). Zu gleichen Ergebnissen kamen Kerp, Steinhilber und Kasemir (44a) bei der Untersuchung von menschlichen Normal- und Antiinsulinseren. Da der Normalbereich der Insulinbindung nur von Seren insulinbehandelter Meerschweinchen überschritten wird, darf angenommen werden, daß es sich bei den infolge Insulinbehandlung auftretenden insulinbindenden Proteinen um Antikörper handelt. Einen weiteren Hinweis dafür, daß die mit der Celluloseadsorptionsmethode erfaßte, über dem Normalbereich liegende Insulinbindung durch Antikörper bedingt ist, erhält man aus den Ergebnissen der biologischen Testung der Antiinsulin-Meerschweinchen-seren an der Maus.

Die beiden Meerschweinchengruppen der vorliegenden Arbeit, die mit dem gleichen Rinder-Schweineinsulin

als Antigen, aber unter Verwendung verschiedener Adjuvantien behandelt wurden, unterscheiden sich in ihrer Antikörperbildung in charakteristischer Weise. In der Meerschweinchengruppe, die Insulin in Freund'schem Adjuvans erhielt, wurde ein hoher Insulinantikörper"titer" erreicht. Der durchschnittlich erreichte maximale Antikörper"titer" dieser Gruppe ($0,84 \mu\text{l}$) liegt mehr als eine Zehnerpotenz höher als in der mit Pikrylchlorid und Insulin behandelten Gruppe ($26,1 \mu\text{l}$). Insulinantikörper lassen sich in den Seren der mit Freund'schem Adjuvans behandelten Tiere noch Wochen nach Absetzen der Antigeninjektionen nachweisen. Es war jedoch nicht möglich, durch die relativ lange ($1/2$ Tage) und hoch dosierte Insulingabe ($38,2 \text{ E Insulin pro Tier}$) in Verbindung mit der Adjuvanswirkung der Mineralöle und Tuberkelbakterien, den Meerschweinchenorganismus zur Bildung von Antikörpern möglicherweise geringerer Spezifität (18) anzuregen, die das endogene Insulin des Immuntieres binden und neutralisieren könnten, wie dies von Lewis (52) diskutiert wurde und Rose u. Mitarb. (66) für Schilddrüsenhormon gelang. Selbst Meerschweinchen, deren Seren Insulinantikörper in solcher Konzentration enthielten, daß im chromatographischen Test $0,01 \text{ ml}$ des Serums in der Lage war, 50% des eingesetzten Insulins zu binden, und von denen $0,1 \text{ ml Serum}$ bei der Maus eine Hyperglykämie über mehrere Stunden bis zu $380 \text{ mg\%}$ hervorrief (Abb. 6, Tier Nr. 28), wiesen selbst keine Anzeichen einer abnormen Zuckerstoffwechsellaage auf.

Die Insulinantikörperbildung ist in der mit Pikrylchlorid und Insulin behandelten Meerschweinchengruppe wesentlich schwächer. Der durchschnittlich erreichte maximale Antikörper"titer" ($26,1 \mu\text{l}$) liegt mehr als eine Zehnerpotenz unter dem durchschnittlichen maximalen "Titer" der Freund's Adjuvansgruppe. Dies beruht vielleicht auf der Beobachtung, daß Meerschweinchen gegen Pikrylchlorid tolerant werden (48), und der ursächlichen Verknüpfung von Entzündung und Adjuvaneffekt. Ohne auf das Problem der Adjuvanswirkung sensibilisierender Substanzen wie Pikrylchlorid näher einzugehen, erscheint es möglich, daß eine im Laufe der Behandlung gegen Pikrylchlorid erworbene passagere Toleranz und ein damit verbundener Rückgang der allergischen Entzündung der Haut der Meerschweinchen mit einer Abschwächung der Adjuvanswirkung verbunden ist (48,23). Daraus könnte sich zum Teil das wesentlich unregelmäßigere Muster der Antikörperbildung im Laufe einer relativ langen (75 Tage) und intensiven Behandlung mit Pikrylchlorid und Insulin (84 E Insulin; 2,4 g Pikrylchlorid pro Tier) erklären lassen.

Auch in dieser Gruppe fanden sich niemals Hinweise für eine diabetische Glucosestoffwechsellage, wie es zu erwarten gewesen wäre, wenn die Tiere Insulinantikörper einer möglicherweise so geringen Spezifität gebildet hätten, daß sie das endogene Insulin des Immuntieres hätten neutralisieren können.

Mehrere Wochen nach der letzten Antigeninjektion ließen sich bei beiden Meerschweinchengruppen mit dem gleichen Insulin, das auch zur Immunsierung verwendet wurde, Hautreaktionen vom "Soforttyp" und vom "verzögerten Typ" auslösen. Die Stärke der Reaktion steht im Einzelfall weder zum Insulinantikörper "titer" noch zum Zeitpunkt des Testes oder zum höchsten überhaupt erreichten "Titer" des Tieres in Beziehung. Wenn man jedoch die durchschnittliche Stärke der Hautreaktionen in beiden Gruppen vergleicht, so liegt die Stärke der Reaktion vom "Soforttyp" und vom "verzögerten Typ" in der mit Freund's Adjuvans behandelten Gruppe deutlich höher.

Es gilt heute als wahrscheinlich, daß beide Typen allergischer Reaktionen, die Reaktion vom "Soforttyp" und die Reaktion vom "verzögerten Typ", miteinander verknüpfte Phänomene sind (46, 67, 63, 10). Es ließe sich dadurch eine übereinstimmend stärkere Reaktion beider Typen in der mit Freund's Adjuvans behandelten Gruppe erklären. Da die Allergie vom "verzögerten Typ" wiederum ein möglicherweise nur frühes Stadium in der Bildung zirkulierender Antikörper ist (68), könnte die Übereinstimmung von stärkerer Hautsensibilität und vermehrter Bildung zirkulierender Antikörper in der Freund's-Adjuvans-Gruppe in der stärkeren Adjuvanswirkung einen gemeinsamen Grund haben.

Die hyperglykämische Wirkung der Antiinsulin-Meerschweinchenserum fanden wir in zwei Versuchs-

gruppen an der Maus gut mit den Ergebnissen der Celluloseadsorptionsmethode korreliert. Der biologische Test an der Maus ist allerdings mit einigen Unsicherheitsfaktoren belastet. Allein der Vorgang der Blutabnahme zur Blutzuckerbestimmung und der Stich in die Bauchhöhle der Tiere bringt Schwankungen des Blutzuckers mit sich. Sie sind hypo- und hyperglykämischer Natur und weichen selten mehr als 30 - 40 mg% vom Ausgangswert ab. Ein anderer Unsicherheitsfaktor ist die unterschiedliche Höhe des Ausgangsblutzuckers bei den einzelnen Tieren, der in Grenzen zwischen 60 und 160 mg% schwankte. Die Ausgangswerte einzelner Mäuse lagen sogar noch unter oder über diesen Werten. Diese unterschiedliche Ausgangslage der Blutzuckerkurven blieb bei der Auswertung der Ergebnisse unberücksichtigt, obgleich man annehmen muß, daß Tiere, die sich an der oberen Grenze des noch als "normal" zu bezeichnenden Blutzuckers befinden, anders reagieren als solche, deren Blutzucker an der unteren Grenze des "Normalen" liegt. Als ein weiterer unspezifischer Effekt ist die blutzuckerverändernde Wirkung von Seren nicht insulinbehandelter Meerschweinchen zu nennen. Allerdings fanden wir, daß nur stark gealtertes Meerschweinchenserum, das sehr häufig eingefroren und wieder aufgetaut worden war, bei Mäusen deutliche Hyperglykämien auslöst. Da die verwendeten Antiinsulin-Meerschweinchenserum ständig bei -20°C gehalten wurden und nur zur "Titer"bestimmung und zur Auslösung der Hyperglykämie an der Maus aufgetaut wurden, kommt

diese Nebenwirkung bei den Versuchen dieser Arbeit nicht in Betracht.

Das sicherste Kriterium für die spezifische hyperglykämische Wirkung von Antiinsulin-Meerschweinchenserum ist der Verlauf des Blutzuckers innerhalb der ersten zwei Stunden nach Injektion des Serums. In allen Fällen von spezifischer Wirkung zeigt der Blutzucker in den ersten Minuten nach der Seruminjektion einen starken Anstieg über den Ausgangswert vor der Injektion, der je nach dem Antikörpergehalt der Seren bis zu 120 Minuten und länger anhält. Im Vergleich mit der Celluloseadsorptionsmethode ist jedoch die Messung der hyperglykämischen Wirkung von Meerschweinchenantiinsulinserum an der Maus und die aus den resultierenden Blutzuckerkurven gewonnene Bewertung der Antiinsulinwirkung dieser Seren ein grobes Verfahren. Man würde die Genauigkeit der biologischen Methode weit überschätzen, wenn man eine dem "Titer" der Celluloseadsorptionsmethode genau entsprechende Meßgröße der insulinneutralisierenden Wirkung der Antiinsulinserum an der Maus als Ergebnis der Korrelation beider Methoden erwarten würde. Daß sich dennoch für eine Serummenge von 1 ml und von 3 ml eine statistisch gesicherte einfache lineare Abhängigkeit der neutralisierenden Wirkung der Antiinsulinserum vom "Titer" der Celluloseadsorptionsmethode ergibt, ist ein Beweis dafür, daß es sich bei den mit der Celluloseadsorptionsmethode bestimmten insulinbindenden Proteinen um echte, im Verlauf der Immunisierung gegen Insulin entstandene, insulinneutralisierende Antikörper handelt.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

1. In Seren von Meerschweinchen lassen sich nach Behandlung mit Rinder-Schweine-Insulin insulinbindende Antikörper nachweisen. Die Meerschweinchen entwickeln im Verlauf der Insulinbehandlung eine Allergie gegen Insulin vom "Soforttyp" und vom "verzögerten Typ".
2. Bei Verwendung von Pikrylchlorid als Adjuvans und sog. Freund's Adjuvans ergeben sich charakteristische quantitative Unterschiede in der Insulinantikörperbildung.
3. Eine Dauerimmunisierung von Meerschweinchen mit relativ großen Mengen von Rinder-Schweine-Insulin und Adjuvantien (Pikrylchlorid, Freund's Adjuvans) über mehrere Monate bleibt ohne Einfluß auf den Blutzucker der Tiere, eine Neutralisation des endogenen Insulins wird also nicht erreicht.
4. Die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung insulinbindender Proteine in Seren insulinbehandelter Meerschweinchen mit der Celluloseadsorptionsmethode von Kerp und Steinhilber lassen sich mit den Ergebnissen eines biologischen Testes an der Maus, der eine Messung der insulinneutralisierenden Wirkung von Meerschweinchenserum erlaubt, korrelieren.

13. ANHANG

Bestimmung der hyperglykämischen Aktivität von
Meerschweinchenantiinsulinserum bei der Maus
(Originale Blutzuckerwerte)

A Wirkung der Blutabnahme allein

Maus Nr.	Titer	BZ nüchtern	BZ 30 M.	BZ 60 M.	BZ 90 M.	BZ 120 M
1		146 mg/%	145 mg/%	119 mg/%	171 mg/%	133 mg/%
2		117 "	129 "	128 "	147 "	150 "
3		125 "	136 "	147 "	143 "	141 "
4		113 "	132 "	134 "	143 "	142 "
5		128 "	152 "	149 "	137 "	145 "
6		124 "	152 "	151 "	151 "	147 "
7		134 "	136 "	130 "	132 "	117 "

B Wirkung von 3 ml 0,9 % NaCl

1	46,6 "	54 "	56 "	50 "	41 "
2	50 "	59 "	-	52 "	41 "
3	66 "	66 "	68 "	55 "	63 "
4	57 "	109 "	107 "	97 "	56 "
5	78 "	78 "	64 "	56 "	56 "
6	74 "	96 "	87 "	86 "	94 "
7	76 "	80 "	77 "	45 "	44 "

G Wirkung von 0,1 ml Meerschweinchenantiinsulinserum

1	24,5 µl	141 "	125 "	120 "	138 "	159 "
2	4,5 "	139 "	148 "	136 "	128 "	127 "
3	2,2 "	132 "	127 "	123 "	133 "	125 "
4	2,1 "	179 "	189 "	185 "	178 "	171 "
5	1,55 "	152 "	168 "	207 "	191 "	190 "
6	0,95 "	108 "	135 "	144 "	154 "	151 "
7	0,81 "	195 "	228 "	253 "	286 "	247 "
8	0,35 "	137 "	155 "	155 "	155 "	147 "
9	0,12 "	163 "	174 "	236 "	266 "	277 "
10	0,06 "	116 "	141 "	160 "	-	180 "
11	0,038 "	119 "	136 "	153 "	188 "	185 "
12	0,034 "	139 "	180 "	202 "	262 "	260 "
13	0,024 "	175 "	214 "	264 "	294 "	300 "
14	0,0092 "	153 "	260 "	356 "	380 "	374 "

D Wirkung von 1 ml Meerschweinchenantiinsulinserum

Maus Nr.	Titer		BZ nüchtern	BZ 30 M.	BZ 60 M.	BZ 90 M.	BZ 120 M
1	gr. als	1000	153 mg/%	166 mg/%	157 mg/%	145 mg/%	147 mg/%
2	" "	ul	172 "	173 "	162 "	173 "	152 "
3	" "		95 "	105 "	92 "	133 "	143 "
4	52	"	126 "	92 "	92 "	110 "	102 "
5	52	"	117 "	100 "	109 "	124 "	135 "
6	39	"	164 "	118 "	97 "	118 "	126 "
7	39	"	145 "	133 "	122 "	139 "	132 "
8	34	"	137 "	148 "	157 "	157 "	137 "
9	32	"	149 "	144 "	137 "	124 "	124 "
10	16,5	"	161 "	138 "	154 "	167 "	137 "
11	15	"	152 "	83 "	67 "	71 "	65 "
12	15	"	120 "	-	116 "	116 "	121 "
13	14,5	"	164 "	180 "	193 "	172 "	154 "
14	12,5	"	159 "	225 "	218 "	169 "	199 "
15	8,8	"	134 "	166 "	199 "	197 "	176 "
16	3	"	186 "	200 "	246 "	234 "	278 "
17	1,8	"	176 "	204 "	272 "	314 "	280 "
18	1,5	"	184 "	253 "	278 "	302 "	308 "
19	1,5	"	150 "	208 "	216 "	200 "	136 "
20	1,4	"	150 "	164 "	204 "	284 "	220 "
21	0,78	"	132 "	154 "	204 "	260 "	318 "
22	0,295	"	207 "	269 "	297 "	344 "	366 "
23	0,017	"	205 "	270 "	311 "	385 "	396 "

E Wirkung von 3 ml Meerschweinchenantiinsulinserum

1	100	"	148 "	176 "	166 "	157 "	147 "
2	74	"	131 "	125 "	126 "	136 "	126 "
3	69	"	120 "	120 "	125 "	129 "	134 "
4	49	"	105 "	133 "	131 "	148 "	150 "
5	39	"	130 "	134 "	123 "	137 "	132 "
6	34	"	105 "	127 "	128 "	136 "	150 "
7	20	"	119 "	126 "	137 "	137 "	137 "
8	16,5	"	113 "	141 "	158 "	154 "	134 "
9	14,5	"	107 "	127 "	-	137 "	134 "
10	8,8	"	107 "	122 "	153 "	159 "	155 "
11	4,3	"	138 "	162 "	187 "	240 "	214 "
12	3	"	159 "	202 "	268 "	307 "	323 "
13	1,5	"	136 "	192 "	212 "	201 "	164 "

F Wirkung von 3 ml gealterten normalen Meerschweinchen-
antiinsulinserums

Maus Nr.	Titer	BZ nüch- tern	BZ 30 M.	BZ 60 M.	BZ 90 M.	BZ 120 M.
1	0,12 µl Serumpool	92 mg/%	108 mg/%	134 mg/%	152 mg/%	152 mg/%
2		118 "	125 "	128 "	139 "	139 "
3		108 "	150 "	190 "	164 "	188 "
4		121 "	120 "	135 "	138 "	164 "
5		157 "	159 "	178 "	212 "	239 "
6		144 "	171 "	204 "	230 "	216 "
7		169 "	216 "	288 "	298 "	286 "

G Wirkung frischen, normalen Meerschweinchenantiinsulinserums

1	0,1 ml	144 "	116 "	111 "	108 "	98 "
2	0,1 "	128 "	109 "	116 "	125 "	127 "
3	0,1 "	142 "	128 "	114 "	116 "	116 "
4	1 "	129 "	112 "	114 "	118 "	122 "
5	2 "	116 "	120 "	123 "	118 "	117 "
9	2 "	138 "	152 "	144 "	143 "	125 "
10	2 "	119 "	147 "	143 "	146 "	132 "
11	2 "	131 "	149 "	147 "	155 "	152 "
12	2 "	173 "	149 "	137 "	133 "	128 "
6	3 "	109 "	119 "	129 "	125 "	112 "
7	3 "	132 "	146 "	155 "	155 "	146 "
8	3 "	101 "	125 "	148 "	150 "	139 "

LITERATURNACHWEIS

1. Armin, J.; Grant, R.T. und Wright, P.H.: Acute Insulin Deficiency Provoked By Single Injections Of Anti-Insulin Serum. J. Physiol. 153, 131. (1960)
2. Armin, J.; Grant, R.T. und Wright, P.H.: Experimental Diabetes In Rats Produced By Parenteral Administration Of Anti-Insulin Serum. J. Physiol. 153, 146. (1960)
3. Armin, J.; Cunningham, N.F.; Grant, R.T.; Lloyd, M.K. und Wright, P.H.: Acute Insulin Deficiency Provoked In The Dog, Pig, and Sheep By Single Injections Of Anti-Insulin Serum. J. Physiol. 157, 64. (1961)
4. Arquilla, E.R. und Stavitsky, A.B.: The Production And Identification Of Antibodies To Insulin And Their Use In Assaying Insulin. J. Clin. Invest. 35, 459 (1956)
5. Arquilla, E.R. und Stavitsky, A.B.: Evidence For The Insulin-Directed Specificity Of Rabbit Anti-Insulin Serum. J. Clin. Invest. 35, 467. (1956)
6. Arquilla, E.R.; Alexander, J.O.; Ptacek, E.D. und Loosli, E.S.: Studies On Insulin Neutralisation By Antisera From Various Species. Diabetes, 11, 412. (1962)
7. Arquilla, E.R. und Finn, J.: Genetic Differences In Antibody Production To Determinant Groups On Insulin. Science, 142, 400. (1963)
8. Arquilla, E.R. und Finn, J.: Insulin Antibody Variations In Rabbits And Guinea Pigs And Multiple Antigenic Determinants On Insulin. J. Exp. Med. 118(1), 55. (1963)
9. Baird, C.W. und Bornstein, J.: Plasma-Insulin And Insulin Resistance. Lancet, 1957 (I), 1111.
10. Benacerraf, B. und Gell, P.G.H.: 4. Tissue Damage Mediated By Delayed Type Of Hypersensitivity. Immunological Specificity Of Delayed And Immediate Hypersensitive Reactions. In: Mechanism Of Cell And Tissue Damage Produced By Immune Reactions. 2. International Symposium On Immunology. Brook Lodge (Michigan, USA), 1961 Hrg. P. Grabar und P. Miescher (Verl. B. Schwabe Co. 1962)
11. Berson, S.A.; Yalow, R.S.; Baumann, A.; Rothschild, M.A. und Newerly, K.: Insulin-J131 Metabolism In Human Subjects: Demonstration Of Insulin Binding Globulin In The Circulation Of Insulin Treated Subjects. J. Clin. Invest. 35, 170. (1956)
12. Berson, S.A. und Yalow, R.S.: Ethanol Fractionation Of Plasma And Electrophoretic Identification Of Insulin Binding Antibody. J. Clin. Invest. 36, 642. (1957)
13. Berson, S.A. und Yalow, R.S.: Kinetics Of Reaction Between Insulin And Insulin Binding Antibody. (Proceedings Of The 49. Annual Meeting). J. Clin. Invest. 36, 873. (1957)

14. Berson, S.A. und Yalow, R.S.: Insulin Antagonists, Insulin Antibodies And Insulin Resistance. *Am.J.Med.* 25, 135. (1958)
15. Berson, S.A. und Yalow, R.S.: Quantitative Aspects Of The Reaction Between Insulin And Insulin Binding Antibodies. *J.Clin.Med.* 38, 1996. (1959)
16. Berson, S.A. und Yalow, R.S.: Recent Studies On Insulin Binding Antibodies. *Ann.N.Y.Acad.Sc.* 82, 338. (1959)
17. Bornstein, J. und Park, C.R.: Inhibition Of Glucose Uptake By The Serum Of Diabetic Rats. *J.Biol.Chem.* 205, S.503. (1953)
18. Boyd, W.C. und Hooker, S.B.: Widened Reactivity Of Antibody Produced By Prolonged Immunisation. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 47, 187. (1941)
19. Boyd, W.C.: Fundamentals Of Immunology (3.Ed.1956) Interscience Publishers, Inc. New York
Kap.: Condition Of Antigenicity
Adjuvants
Autoimmunization And Disease
20. Burrows, B.A.; Peters, T. und Lowell, F.C.: Physical Binding Of Insulin By Gamma-Globulin Of Insulin-Resistant Subjects. *J.Clin.Invest.* 36, 393. (1957)
21. Cunningham, N.F.; Patterson, O.S.P. und Wright, P.H.: Acute Insulin Deficiency Provoked In Sheep And Cows By Single Injections Of Anti-Insulin Serum. *J.Physiol.(London)* 169, 137. (1963)
22. Dienes, L. und Schoenheit, E.W.: Certain Characteristics Of The Infection Processes In Connection With The Influence Exerted On The Immunity Response. *J.Imm.* 19, S.41. (1930)
23. Edsall, G.: Factors Affecting The Antibody Response, (Kap.4) Physical State Of The Antigen: Adjuvants
In: The Nature And Significance Of The Antibody Response. (New York, Col.Univ.Press, 1953)
24. Eisen, H.N.; Orris, L. und Belman, S.: Elicitation Of Delayed Allergic Skin Reactions With Haptens: The Dependence On Hapten Combination With Protein. *J.Exp.Med.* 95, 473. (1952)
25. Field, J.B. und Stetten, De Witt.: Humoral Insulin Antagonism Associated With Diabetic Acidosis. *J.Amer.Med.* 21, 339. (1956)
26. de Fillipis, V. und Iannacone, A.: Insulin-Neutralizing Activity Of Gamma-Globulins Derived From The Serum Of An Lancelot, 1952(I), 1192
27. Fischel, E.E.; Kabat, E.A.; Stoerk, H.C. und Bezer, A.E.: The Role Of Tubercle Bacilli In Adjuvant Emulsions On Antibody Production To Egg Albumin. *J.Imm.* 69, 611. (1952)
28. Freund, J.; Casals, J. und Page-Hosmer, E.: Sensitization And Antibody Formation After Injection Of Tubercle Bacilli And Paroffin Oil. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 37, 309. (1937)

29. Freund, J.; Casals-Ariet, J. und Schaefer-Genghof, D.:
The Synergistic Effect Of Paraffin-Oil Combined
With Heat-Killed Tubercle Bacilli. *J. Imm.* 38, 67 (1940)
30. Freund, J. und Mc Dermott, K.: Sensitization To Horse Serum
By Means Of Adjuvants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*
49, 548. (1942)
31. Freund, J.: The Mode Of Action Of Immunologic Adjuvants.
Adv. Tub. Res. 7, 130. (1956)
32. Friedewald, W.F.: Adjuvants In Immunization With Influenza
Virus Vaccines. *J. Exp. Med.* 80, 477. (1944)
33. Goldsmith, L. und Moloney, P.J.: Chromatography Of Guinea-Pig
Native Insulin. *Bioch. J.* 66, 432. (1957)
34. Grabar, P. und Bussard, A.: Mise En Evidence d'Anticorps
Antihormonaux Précipitants Et Non Précipitants
Dans Le Sérum De Lapin Antigonadotrope.
Compt. Rend. Acad. Sci. 227, 403. (1948)
35. Grabar, P.: Einleitung in: Immunopathologie in Klinik und
Forschung und das Problem der Autoantikörper.
(1961, 2. Aufl.)
Hrs. Miescher, P. und Vorländer, K.O.
36. Gregor, W.H.; Martin, J.M.; Williamson, J.R.; Lacy, P.E. und Kipnis,
D.M.: A Studie Of The Diabetic Syndrome Produced
In Rats By Anti-Insulin Serum. *Diabetes*, 12, 73. (1963)
37. Grodsky, G.M. und Forsham, P.H.: Comparative Binding Of Beef
And Human Insulin Antibodies Produced In Man And
Guinea Pigs. *J. Clin. Invest.* 40, 799. (1961)
38. Hampton, A.G.; Hunt, W.B.; Mulholland, H.B.: Insulin Resistance.
J. Am. Med. Ass. 161, 788. (1956)
39. Heiskell, C.L.; Florsheim, W.H. und Meister, L.: Electrophoretic
Distribution Of Allergic And Hormonal Fractions Of
Commercial Insulins. *Diabetes*, 8, 388. (1959)
40. Hirata, Y. und Blumenthal, H.T.: Blood Sugar And Anti-Insulin
Levels Of Actively And Passively Immunized Rabbits.
Diabetes, 11, 26. (1962)
41. Jones, E.V. und Cunliffe, A.C.: A Precipitating Antibody
To Insulin. *Nature*, (Lo.) 192, 136. (1961)
42. Kalant, N.; Gomberg, C. und Schucher, R.: The Effect Of
Insulin Binding Antibodies On Insulin Sensitivity.
Lancet, 1958 (II) 614
43. Kalant, N.; Schucher, R. und Galley, W.C.: Effect Of
Antibodies On Removal Of Insulin From The
Circulation.
Canad. J. Bioch. Physiol. 39, (2), 1433. (1961)
44. Kerp, L. und Steinhilber, S.: Quantitativer Nachweis Insulin-
bindender Proteine durch Differentialadsorption.
In: *Protides Of The Biological Fluids* (Proc. 2. Coll.
Brugs, 1963). Elsevier Publ. Com. 1964.
- 44a Kerp, L. Steinhilber, S. und Kasemir, H.: Ein Verfahren zum
Nachweis insulinbindender Antikörper durch Diffe-
rentialadsorption. *Klin. Wschr.* 1966 in Druck.

45. Lacy, P.E.: Electron Microscopic And Fluorescent Antibody Studies On Islets Of Langerhans. Exp.Cell. Research,Suppl.7, 296. (1959)
46. Landsteiner, K. und Jacobs,J.: Studies On The Sensitization Of Animals With Simple Chemical Compounds.2. J.Exp. Med. 64, 625. (1936)
47. Landsteiner, K. und Jacobs,J.: Studies On The Sensitization Of Animals With Simple Chemical Compounds.1. J.Exp.Med. 61, 643. (1935)
48. Landsteiner, K. und Chase, M.W.: Studies On The Sensitization Of Animals With Simple Chemical Compounds.4.: Anaphylaxis Induced By Picryl Chloride And 2:4 Dinitrochlorobenzene. J.Exp.Med. 66, 337. (1937)
49. Lapresle, C.: Die Insulin-Antikörper. In: Immunopathologie in Klinik und Forschung, 2.Aufl. Hrg. Miescher,P. und Vorländer,K.O.
50. Lewis, P.A. und Loomis,D.: Allergic Irritability. The Formation Of Anti-Sheep Hemolytic Amboceptor In The Normal And Tuberculous Guinea Pig.J.Exp. Med. 40, 503. (1926)
51. Lewis, P.A. und Loomis, D.: Allergic Irritability. 3.The Influence Of Chronic Infections And Of Trypan Blue On The Formation Of Specific Antibodies. J.Exp.Med. 43, 263. (1926)
52. Lewis, J.H.: The Antigenic Properties Of Insulin. J.A.M.A. 108, 1336. (1937)
53. Lowell, F.C.: Evidence For The Existence Of Two Antibodies For Crystalline Insulin. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 50, 167. (1942)
54. Lowell, F.C.: Immunologic Studies In Insulin Resistance. 1.Report Of A Case Exhibiting Variations In Resistance And Allergy To Insulin. J.Clin.Invest. 23, 225. (1944)
55. Lowell, F.C.: Immunologic Studies In Insulin Resistance. 2.The Presence Of A Neutralizing Factor In The Blood Exhibiting Some Characteristics Of An Antibody. J.Clin.Invest. 23, 233. (1944)
56. Lowell, F.C.: Immunologic Studies In Insulin Resistance. 3.Measurement Of An Insulin Antagonist In The Serum Of An Insulin-Resistant Patient By The Blood Sugar Curve Method In Mice. J.Clin.Invest. 28, 57. (1947)
57. Marks, H.P. und Young,F.G.: Species Variation In The Insulin Content Of Pancreas.Nature, 146,31.(1940)
58. Marsh, J.B. und Haugaard,N.: The Effect Of Serum From Insulin-Resistant Cases On The Combination Of Insulin With The Rat Diaphragm.J.Clin.Invest. 31, 107. (1952)
59. Moloney, P.J. und Coval,M.: Antigenicity Of Insulin: Diabetes Induced By Specific Antibodies. Bioch.J. 59, 179. (1955)

60. Moloney, P.J. und Aprile, M.A.: On The Antigenicity Of Insulin: Flocculation Of Insulin-Antiinsulin. *Canad. J. Bioch. Physiol.* 37, 797. (1959)
61. Morse, J.H. und Berson, S.A.: Rapid Production And Detection Of Insulin-Binding Antibodies In Rabbits And Guinea Pigs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 101, 722. (1959)
62. Morse, J.M.: Heterogeneity Of Insulin-Antibody Complexes In Rabbits And Guinea Pigs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 102, 494. (1960)
63. Pappenheimer, A.M.; Scharff, M. und Uhr, J.W.: Delayed Hypersensitivity And Its Possible Relation In Antibody Formation. In: *Mechanismus Of Hypersensitivity*. (Intern. Symp. Henry Ford Hospital, 1. Ed. 1959)
64. Rist, N.: Les Lésions Métastatiques Produites Par Les Bacilles Tuberculeux Morts Enrobés Dans Les Paraffines. *Ann. Inst. Pasteur* 61, 121. (1938)
65. Robinson, B.H.B. und Wright, P.H.: Guinea-Pig Anti-Insulin Serum. *J. Physiol.* 155, 302. (1961)
66. Rose, N.R.; Kite, J.H. und Doebbler, T.K.: Mechanism Of Tissue Damage. In *Experimental Autoimmune Disease*. In: *Mechanism Of Cell And Tissue Damage Produced By Immun Reactions*. 2. Intern. Symp. On Immunopathology Hrg.: Grabar, P. und Miescher, P. (Benno Schwabe Verl. 1962)
67. Salvin, S.B.: Occurrence Of Delayed Hypersensitivity During The Development Of Arthus Type Hypersensitivity. *J. Exp. Med.* 107, 109. (1958)
68. Salvin, S.B. und Smith, R.F.: Delayed Hypersensitivity And The Anamnestic Response. *J. Imm.* 84, 449. (1960)
69. Sanger, F.: Species Differences In Insulin. *Nature*, 164, 529. (1940)
70. Skom, J.H. und Talmage, D.W.: The Role Of Nonprecipitating Insulin Antibodies In Diabetes. *J. Clin. Invest.* 37, 787. (1958)
71. Stavitsky, A.B. und Arquilla, E.R.: Insulin-Antikörper und ihre klin. Bedeutung. *Klin. Wschr.* 36(1), 341. (1958)
72. Steigerwald, H. und Spielmann, W.: Nachweis von Insulinantikörpern bei Diabetikern mit Insulinresistenz im Hämagglutinationstest und im Coombs-Test. *Kl. Wschr.* 34, 80. (1956)
73. Steigerwald, H.; Spielmann, W.; Fries, H. und Grebe, S.F.: Neuere Untersuchungen über die Antigenwirkung des Insulins. *Kl. Wschr.* 38, 973. (1960)
74. Steigerwald, H.: Insulinantikörper. Blut, 7, 64. (1961)
75. Stoerk, H.C.: The Role Of Mycobacteria In Allergic Manifestations. In: *Mechanisms Of Hypersensitivity*. Intern. Symp. Henry Ford Hospital, 1. Ed. 1959.

76. Striebel, J.L.; Molnar, G.D. und Owen, C.A.: Insulin-Binding Antibodies In Plasma After Administration Of Insulin To Rabbits. *Diabetes*, 11, 527. (1962)
77. Vallée, M.H.: Bacille Tuberculeux Et Excipient Irrésorbable. *Compt.Rend.Séance Acad.Sc.* 178, 152. (1924)
78. Wassermann, P.; Broh-Kahn, R.H. und Mirsky, A.: The Antigenic Property Of Insulin. *J.Imm.* 38, 213. (1940)
79. Welsh, G.W.; Henley, E.D.; Williams, R.H. und Cox, R.W.: Insulin J131 Metabolism In Man. *Am.J.Med.* 21, 324. (1956)
80. White, R.G.; Coons, A.H. und Conolly, J.M.: Studies On Antibody Production. 4. The Role Of A Wax Fraction Of Mycobacterium Tuberculosis In Adjuvant Emulsion On The Production Of Antibody To Egg Albumin. *J.Exp.Med.* 102, 83. (1955)
81. White, R.G.: The Adjuvant Effects Of Mycobacterial Cells And Fractions. In: Mechanisms Of Hypersensitivity, Intern.Sympos. Henry Ford Hospital, 1959, 1. Ed.
82. Wright, P.H.: The Effect Of Insulin Antibodies On Glucose Uptake By The Isolated Rat Diaphragm. *Bioch.J.* 71, 633. (1959)
83. Wright, P.H.: Production Of Acute Insulin Deficiency By Administration Of Insulin Antiserum. *Nature*, 183, 829. (1959)
84. Wright, P.H.; Kreisberg, R.A.; Halpern, B. und Dolkart, R.E.: Properties Of Insulin Antibodies Produced By The Guinea Pig, Horse, Sheep And Man. *Diabetes*, 11, 519. (1962)
85. Yalow, R.S. und Berson, S.A.: Apparent Inhibition Of Liver Insulinase Activity By Serum And Serum Fractions Containing Insulin-Binding Antibodies. *J.Clin.Invest.* 36, 648. (1957)
86. Yasuo Yagi; Maier, P. und Pressmann, D.: Two Different Anti-Insulin Antibodies In Guinea Pig Antisera. *J.Imm.* 89, 442. (1962)
87. Yasuo Yagi; Maier, P. und Pressmann, D.: Immunoelectrophoretic Identification Of Guinea Pig Antiinsulin Antibodies. *J.Imm.* 89, 736. (1962)

Zum Schluß dieser Arbeit erlaube ich mir
Herrn Professor Dr. Dr.h.c. Dr.h.c.
L. HEILMEYER ergebensten Dank für die gebotene
Arbeitsmöglichkeit auszusprechen.

Herrn Dozent Dr. L. KERP danke ich herzlich
für die Überlassung des Themas, die stete
Hilfsbereitschaft und die Übernahme des
Referates.

LEBENS LAUF

Am 13. Juli 1939 wurde ich als zweiter Sohn des Dipl.Kfm. Richard Berning und seiner Ehefrau Margarete Berning geb. Bahr in Berlin geboren. Nach Besuch der Volksschule in Heepen (Westf.) wurde ich Ostern 1950 in die Helmholtz-Oberrealschule, Bielefeld (Westf.) aufgenommen, an der ich Ostern 1959 die Reifeprüfung absolvierte. Im gleichen Jahr schrieb ich mich an der Universität in Münster (Westf.) zum Medizinstudium ein, wo ich mein Vorphysikum und Physikum bestand und das erste klinische Semester studierte. Je einklinisches Semester belegte ich in Tübingen und Würzburg und kam zum Sommersemester 1963 nach Freiburg i.Br. Hier bestand ich im Sommer 1965 das medizinische Staatsexamen.

Im Herbst 1965 war ich 4 Monate als Med.Ass. im Hygiene Institut der Universität Freiburg tätig. Jetzt bin ich in Bremerhaven im Städt. Krankenhaus Mitte als Med.Ass. auf der Chirurgischen Abteilung beschäftigt.

